



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

Co-producción de ectoína y PHB durante el tratamiento de emisiones diluidas de metano

Autor:

Sadornil Delgado, Lidia Jimena

Tutor 1:

Lebrero Fernández, Raquel

Tutor 2:

Muñoz Torre, Raúl

Cotutor:

Cantera Ruiz, Sara

**Dpto. Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente
Valladolid, julio del 2017**



Universidad de Valladolid



ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



RESUMEN-ABSTRACT



RESUMEN

La investigación planteada se enfocó hacia dos vertientes principales: por un lado, se basó en el estudio de la producción de sustancias de alto valor industrial (ectoína, polihidroxicanoatos (PHAs) y exopolisacáridos (EPSs)) a partir de emisiones diluidas de metano (CH_4) en dos biorreactores de columna de burbujeo, uno inoculado con un microorganismo metanótrofo halotolerante y alcalófilo, *Methylobacterium alcaliphilum* 20 Z (R1), y otro con un consorcio metanótrofo enriquecido a partir de fuentes salinas de producción de metano (R2). Además, se probaron dos concentraciones de magnesio: $0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (condición 1) y $0.02 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ (condición 2) para comprobar cómo este nutriente específico afectaba a la producción de ectoína, PHAs y EPSs, así como a la degradación de CH_4 . Los resultados mostraron que la presencia de Mg^{2+} fue determinante en la producción de ectoína, ya que a concentraciones mayores de Mg^{2+} los valores de ectoína obtenidos (94.5 ± 18.2 y $73.2 \pm 6.3 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$, en R1 y R2, respectivamente) fueron 2 veces mayores que los detectados a baja concentración (53.0 ± 13.7 y $55.9 \pm 11.2 \text{ mg ectoína g biomasa}^{-1}$, en R1 y R2, respectivamente). En el caso de los EPSs se observó también el doble de producción de este subproducto bajo altas concentraciones de Mg^{2+} hallándose valores de 2150 ± 357 y $2300 \pm 608 \text{ mg EPSs L}^{-1}$, en R1 y R2, respectivamente. Sin embargo, el efecto contrario fue observado en el estudio de producción de PHAs, donde menores concentraciones de Mg^{2+} fomentaron la producción de más PHAs en R2, ya que se trata de formaciones biopoliméricas que aparecen cuando hay escasez de algún nutriente esencial en el medio y están relacionadas con poblaciones mixtas ($1.4 \pm 0.3 \text{ mg PHAs g biomasa}^{-1}$ con $0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$ frente a valores de $2.1 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$). En el caso de la degradación de CH_4 , el Mg^{2+} a las concentraciones probadas no tuvo un efecto determinante. Por otro lado, se realizó una investigación simultánea basada en el enriquecimiento, selección, aislamiento e identificación de microorganismos metanótrofos novedosos. En esta investigación, se aislaron dos nuevas especies de bacterias, *Halomonas sp.* y *Alishewanella sp.* En ambos casos, se determinó su capacidad de eliminar CH_4 y en el caso de *Halomonas sp.* se determinó como productor de ectoína. Además, se optimizaron sus condiciones de crecimiento y se evaluaron las posibles fuentes de carbono que podían metabolizar. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman la viabilidad técnica de una nueva generación de biorrefinerías basadas en el tratamiento de emisiones de metano a través de metanótrofos extremófilos. Además, este estudio prueba la importancia de las condiciones de operación dependiendo del subproducto que se quiera sintetizar en la industria.

PALABRAS CLAVE: Tratamiento de CH_4 , Ectoína, PHAs, EPSs, Metanótrofos, *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, Biorrefinería.



ABSTRACT

The research here presented was focused on two main aspects: On the one hand, the first study was based on the production of high added value products (ectoine, polyhydroxyalkanoates (PHAs) and exopolysaccharides (EPSs)) combined with the abatement of methane. Two bioreactors inoculated with *Methylophilum alcaliphilum* 20Z (R1), and with new consortia of methanotrophic bacteria enriched from high salinity sources (R2) were operated. Moreover, two different magnesium concentrations; 0.2 g Mg²⁺ L⁻¹ (condition 1) and 0.02 g Mg²⁺ L⁻¹ (condition 2) were tested. The results obtained showed that Mg²⁺ had an effect on ectoine production since under condition 1 (94.5 ± 18.2 and 73.2 ± 6.3 mg ectoine g biomass⁻¹ in R1 and R2, respectively) the ectoine detected was twice higher than under condition 2 (53.0 ± 13.7 and 55.9 ± 11.2 mg ectoine g biomass⁻¹ in R1 and R2, respectively). The same effect of Mg²⁺ was observed in EPSs detection, since the EPSs values obtained in condition 1 (2150 ± 357 and 2300 ± 608 mg EPSs L⁻¹ in R1 and R2, respectively) were 2 times higher than in condition 2. However, the opposite response was detected when studying PHAs, where lower Mg²⁺ concentrations promoted higher PHAs values in R2 (1.4 ± 0.3 mg PHAs g biomass⁻¹ at 0.2 g L⁻¹ Mg²⁺ compared to 2.1 ± 0.3 mg PHAs g biomass⁻¹ at 0.02 g Mg²⁺ L⁻¹). Regarding methane abatement, no effect of Mg²⁺ concentrations was detected. Additionally, another research was carried out based on the enrichment, selection, isolation and identification of new methanotrophic microorganisms. The microorganisms found capable of degrading methane and producing ectoine were classified as novel species of the genera *Halomonas* and *Alishwanella*, two marine genera that until now had not been determined as methanotrophs. In both cases, they were determined as methane degrading bacteria and in the case of *Halomonas* sp. it was also described as an ectoine producer. Furthermore, the optimal conditions together with the possible sources of energy used for their growth were evaluated. This work confirmed the technical feasibility of a new generation of biorefineries based on the abatement of diluted methane emissions using extremophile methanotrophs and demonstrated the importance of the operational conditions on the production of high added value products demanded by the industry.

KEYWORDS: Treatment of CH₄, ectoine, PHAs, EPSs, *Methylophilum alcaliphilum* 20Z, methanotrophs, biorefinería



ÍNDICE



Universidad de Valladolid



Índice

ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES



1.INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problemática ambiental	3
1.2 Métodos de tratamiento.....	5
1.3 Microbiología del tratamiento de metano.....	6
1.4 Bioconversión de metano a productos de alto valor añadido.....	9
1.4.1 Ectoína	10
1.4.2 Bioplásticos	12
1.4.3 Exopolisacáridos.....	14
1.5 Perspectiva.....	15
2.OBJETIVOS.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1 BIORREACTORES OPERADOS EN CONTINUO PARA LA ELIMINACIÓN DE CH ₄ COMBINADA CON LA PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA, PHAs Y EPSs EN DIFERENTES CONDICIONES RESTRICTIVAS DE Mg ²⁺	23
3.1.1 Químicos y medio mineral salino	23
3.1.2 Inóculos utilizados.....	24
3.1.3 Operación con diferentes condiciones de Mg ²⁺	25
3.2 ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE NUEVOS METANÓTROFOS CAPACES DE PRODUCIR ECTOINA	27
3.2.1 Enriquecimiento y estudios poblacionales previos.....	27
3.2.2 Químicos y medio mineral salino usado en los experimentos de aislamiento	27
3.2.3 Aislamiento y selección de nuevos microorganismos	28
3.2.4 Purificación de aislados.....	28
3.2.5 Caracterización de nuevos aislados metanótrofos.....	30
□ Experimento en lote para optimizar el pH, temperatura y salinidad de crecimiento de los nuevos aislados metanótrofos.....	30



□ Prueba API 50CH y API 20A.....	30
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	31
3.3.1 Monitorización de las concentraciones de CO ₂ y CH ₄	31
3.3.2 Medida de SST	31
3.3.3 Análisis de ectoína intracelular	31
3.3.4 Análisis de ectoína extracelular	32
3.3.5 Análisis de PHAs.....	32
3.3.6 Análisis de EPSs	33
3.3.5 Tratamiento de datos.....	33
4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1 BIORREACTORES OPERADOS EN CONTINUO PARA LA ELIMINACIÓN DE CH ₄ COMBINADA CON LA PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA, PHA Y EPSs EN DIFERENTES CONDICIONES RESTRICTIVAS DE Mg ²⁺	37
4.1.1 Producción de ectoína intracelular y extracelular.....	37
4.1.2 Producción de PHAs	39
4.1.3 Producción de EPS	41
4.1.4 Parámetros operacionales.....	42
• Capacidad de eliminación (CE) y producción de CO ₂ (PTCO ₂)	42
• Eficiencia de eliminación (EE)	44
4.2 ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE NUEVOS METANÓTROFOS CAPACES DE PRODUCIR ECTOINA	45
- pH óptimo de crecimiento	47
- pH óptimo de crecimiento	52
5.CONCLUSIONES	55
6.BIBLIOGRAFÍA.....	59



ANEXOS..... 71

ANEXO I 73

I.I Curva de calibración de metano 73

I.II Curva de calibración de dióxido de carbono 73

I.III Recta de calibración de la ectoína..... 74

I.IV Cromatogramas de HPLC para la detección de ectoína:..... 74

ANEXO II 75

II.I Tablas de los datos medios del biorreactor *Methylomicrobium*
alcaliphilum 20Z y consorcio..... 75

- Condición 0.2 gL⁻¹ de Mg²⁺ 75
- Parámetros operacionales 75
- Ectoína intracelular y PHAs 76
- Exopolisacáridos..... 77

II.II Tablas de los datos medios del biorreactor *Methylomicrobium*
alcaliphilum 20Z y consorcio..... 78

- Condición 0.02 gL⁻¹ de Mg²⁺ 78
- Parámetros operacionales 78
- Ectoína intracelular y PHAs 79
- Exopolisacáridos..... 80

ANEXO III 81

- III.I COMPONENTES DEL BIOMIX..... 81
- III.II SECUENCIA DE LOS CEBADORES (5´- 3´)..... 81



-
- III.III ENSAYO DE OPTIMIZACIÓN DE pH EN ALISHEWANELLA..... 82
 - III.IV ENSAYO DE OPTIMIZACIÓN DE TEMPERATURA EN ALISHEWANELLA..... 85
 - III.V ENSAYO DE OPTIMIZACIÓN DE pH EN HALOMONAS..... 88
 - III.VI ENSAYO DE OPTIMIZACIÓN DE TEMPERATURA EN HALOMONAS..... 91
 - III.VII AZÚCARES PRUEBAS API 50 CH Y 20A..... 93



1.INTRODUCCIÓN



1.1 Problemática ambiental

El metano es el segundo gas más importante de efecto invernadero (GEI), representa un 20% del total de GEIs (Figura 1), posee un potencial de calentamiento global 25 veces más alto que el del CO₂ y su concentración atmosférica aumenta preocupantemente cada año (0.2-1%) debido principalmente a actividades antropogénicas [1][2].

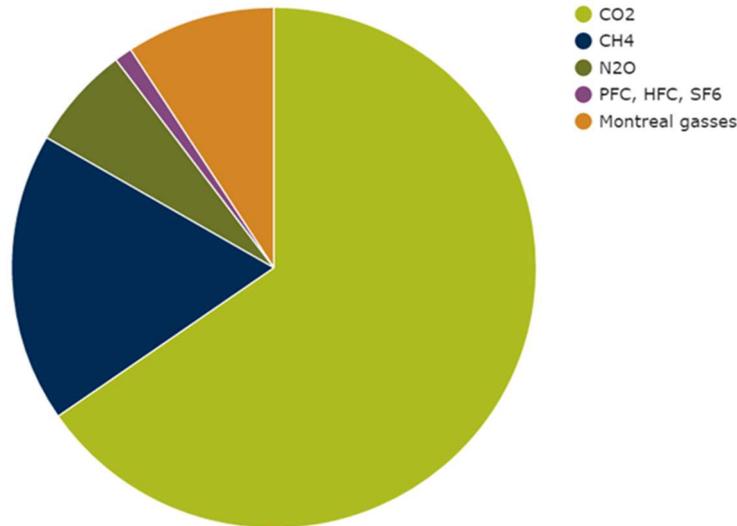


Figura 1: Contribución de los diferentes GEI tal como se prevé en el protocolo de Kyoto y Montreal a la concentración global de gases de invernadero en 2012 (472 ppm CO₂ eq)[3].

A pesar de que el metano se produce naturalmente en la digestión anaerobia de la materia orgánica por la acción última de microorganismos metanogénicos [4], su concentración atmosférica ha alcanzado concentraciones de hasta un 150% superiores a las de la era pre-industrial [5][3], principalmente debido al incremento de producción de este gas como causa de las actividades humanas (Figura 2), las cuales representan un 60% del total de emisiones de metano[6][7]. Las principales fuentes antropogénicas son: zonas de extracción y transporte de gas natural (33%), la fermentación entérica (granjas de rumiantes) (22%), gestión de residuos (20%), minas de carbón (9%), gestión de estiércol (8%) y otros (6%) (Figura 3) [8][9].

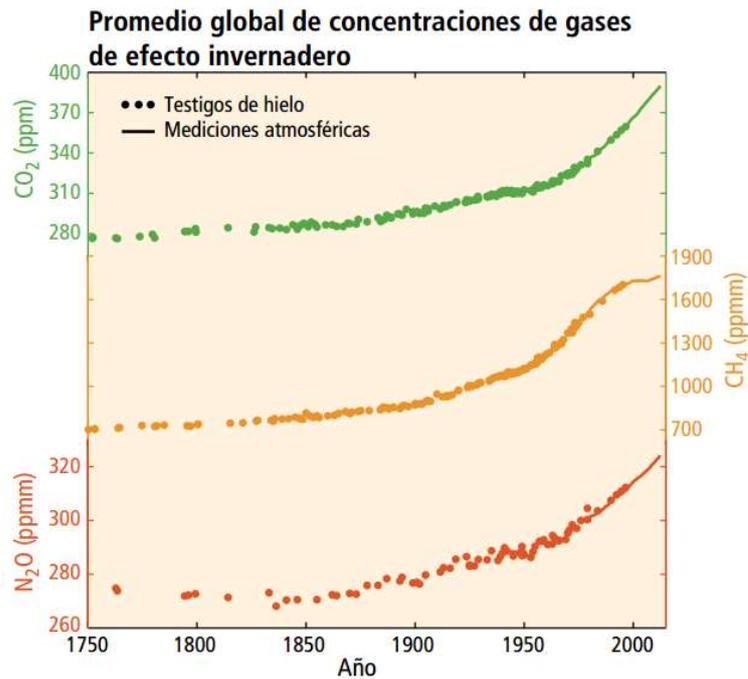


Figura 2. Se muestran los cambios en las concentraciones atmosféricas globales de los gases de efecto invernadero en diferentes colores. En color verde aparece la concentración en ppm del dióxido de carbono; en color rojo aparece el monóxido de nitrógeno en concentraciones de ppb; Las concentraciones de metano se representan el color naranja también en ppb [10].

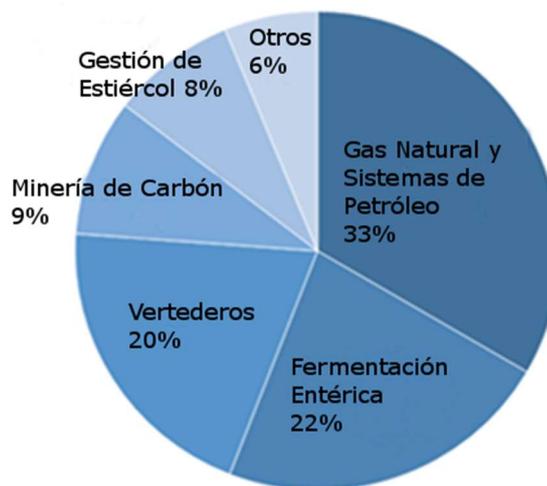


Figura 3. Principales fuentes emisoras de metano producidas por el hombre en 2015 [11]

Si bien es verdad que el metano producido a través de actividades humanas se puede usar para recuperar energía, para ello se requieren concentraciones de este gas mayores al 30% (v/v) en la emisión gaseosa [7][12]. El problema es que dichas emisiones, sólo se encuentran en escenarios limitados, como es el caso de grandes vertederos o de plantas de tratamiento de aguas residuales, en los cuales se puede producir energía por combustión de biogás (ya

que su incineración es altamente exotérmica). En el resto de los casos (56 % del total de emisiones antropogénicas [6]), las emisiones de metano contienen concentraciones de este gas por debajo del 5% (emisiones diluidas y difusas), lo que no las hace eficientes, ni adecuadas económicamente para la recuperación de energía [13][7][14]. Estas emisiones diluidas y difusas de CH₄ se pueden encontrar en antiguos vertederos (0-20%), en minas de carbón a cielo abierto (0.1-1%), en tanques cubiertos de almacenamiento de estiércol líquido (0-3%), o en operaciones donde el ganado está confinado (< 1%)[7].

Debido a los crecientes daños que está generando el metano, tanto ambientales como a la salud humana y la economía, se han desarrollado diferentes estrategias políticas y sociales para combatir las emisiones de GEIs [15][16][12][17][18][5]. En este contexto, los miembros de las Naciones Unidas se han comprometido a reducir las emisiones de los GEIs con el objetivo de mantener la temperatura media global 2 °C por encima de los niveles pre-industriales, siendo por tanto fundamental la reducción de la llegada de estos gases a la atmósfera. Así mismo, la Unión Europea, siguiendo la tendencia del conjunto de medidas adoptadas en 2012 y según el último informe publicado en octubre de 2014 “Tendencias y Proyecciones” se ha propuesto alcanzar en 2020 niveles de GEIs por debajo del 21% de los niveles de 1990. Si las medidas adicionales previstas por los Estados miembros (adopción de la Directiva sobre eficiencia energética, cumplimiento de los objetivos en emisiones de flotas de coches y caravanas, y un nuevo reglamento sobre gases fluorados) se aplicasen completamente, la reducción global de GEIs podría alcanzar en 2020 hasta el 24% en comparación con 1990. A nivel nacional, España ha desarrollado la Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia (EECEL) 2007-2012-2020, la cual forma parte de la Estrategia Española de Desarrollo Sostenible (EEDS), como medida de prevención del cambio climático y sus efectos, adoptando diferentes medidas de actuación en contribución al desarrollo sostenible y energía limpia [18]. Además, en el caso de Castilla y León, también se han definido una serie de actuaciones con el objetivo de impulsar, coordinar y evaluar las actuaciones de lucha contra el cambio climático en la llamada Estrategia Regional contra el Cambio Climático en Castilla y León 2009-2012-2020 [19].

Con el fin de solventar la problemática ambiental generada por estas emisiones de metano, se han desarrollado diferentes formas de tratamiento que se comentan a continuación.

1.2 Métodos de tratamiento

Existen métodos de tratamiento físico-químicos para reducir las emisiones de metano, como la incineración y la adsorción en carbono activo [20][16]. Sin

embargo, éstos no son ni sostenibles ni económicamente viables para el tratamiento de emisiones diluidas de metano, porque generan compuestos secundarios nocivos y además, su coste es muy elevado [21]. A este respecto, una alternativa prometedora para controlar las emisiones de CH_4 a la atmósfera, ya probada como eficaz y respetuosa con el medio ambiente en el tratamiento de otras emisiones gaseosas industriales de sustancias orgánicas volátiles y odoríferas, son los tratamientos biológicos de oxidación en biorreactores específicos.

Estos reactores biológicos se basan en el tratamiento de sustancias nocivas para el medio ambiente y la salud humana a través de la acción de microorganismos especializados, ya sean bacterias, algas u hongos. Dichos tratamientos, además de poseer bajo coste son mucho más eficientes en la eliminación de corrientes gaseosas con contaminantes o compuestos olorosos que los métodos físico-químicos, especialmente cuando estos contaminantes se encuentran en baja concentración en la emisión, además los tratamientos biológicos son ambientalmente más respetuosos [22][23].

En el caso de las tecnologías de tratamiento biológico del metano llevan desarrollándose desde hace aproximadamente 40 años. Las configuraciones de biorreactores que se han aplicado hasta ahora se clasifican en dos grupos diferentes: (i) biorreactores de lecho empacado y (ii) biorreactores de crecimiento en suspensión. Entre las biotecnologías convencionales, las tecnologías de lecho compacto: biofiltros y biofiltros percoladores, son las más utilizadas para la reducción del metano, mientras que los reactores de crecimiento en suspensión más representativos son los tanques agitados y los biorreactores de burbujeo.

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas que presentan los sistemas biológicos, su viabilidad técnico-económica para eliminar metano se encuentra todavía limitada a causa de: a) La baja transferencia del metano desde la emisión gaseosa a la comunidad microbiana como resultado de su baja solubilidad acuosa; b) los pocos estudios que existen sobre el crecimiento, estabilidad y afinidad microbiana por el CH_4 , así como la producción de sustancias de alto valor añadido por los microorganismos que degradan metano, dentro de los cuales destacan los osmoprotectores como la ectoína, cierto tipo de polímeros biodegradables (polihidroxicanoatos (PHAs)) y los exopolisacáridos (EPSs), usados en un amplio abanico de sectores industriales [1][21][22].

1.3 Microbiología del tratamiento de metano

El tratamiento biológico del metano se lleva a cabo por una serie de bacterias y arqueas denominadas metanótrofas. Los metanótrofos son los únicos microorganismos capaces de usar metano como única fuente de carbono y

energía. Se clasifican en el grupo bacteriano de los metilotróficos, conformado por organismos que utilizan sustratos con un solo átomo de carbono para su metabolismo [4]. Los metanótrofos son principalmente aerobios (MOB) y oxidan el metano usando como aceptor de electrones el oxígeno y produciendo dióxido de carbono y agua ($\text{CH}_4 + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$) [25][4]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunos metanótrofos también son capaces de utilizar como fuente de carbono compuestos con más de un átomo de carbono bajo ciertas condiciones ambientales [23][26][27][28][29].

Los metanótrofos se han clasificado clásicamente dentro de tres grupos taxonómicos de acuerdo a sus características morfológicas y fisiológicas: metanótrofos de tipo I (γ -proteobacteria), tipo II (α -proteobacteria) y tipo X [23][4]. Los de tipo I y II se diferencian en la ruta metabólica usada para la asimilación del formaldehído: normalmente los de tipo I asimilan el formaldehído vía ribulosa monofosfato (RuMP), mientras que los de tipo II utilizan la ruta de la serina. Los metanótrofos de tipo X utilizan la ruta RuMP para asimilar formaldehído, aunque sintetizan ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa propia de la ruta de la serina para fijar CO_2 . Además, crecen a temperaturas mayores que los de tipo I y II [4][30].

Gracias al creciente desarrollo de la genómica y transcriptómica se ha desarrollado una clasificación filogenética de los metanótrofos más moderna y rigurosa basada en el gen 16S rARN. De acuerdo a ésta, los metanótrofos se clasifican principalmente en tres grupos filogenéticos: *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Verrucomicrobia* [31][32]. Entre los metanótrofos más destacados de la clase *Gammaproteobacteria*, se encuentran los géneros *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* y *Methylococcus*. En el caso de la clase de *Alphaproteobacteria* destacan *Methylocapsa*, *Methylocella*, *Methylosinus* y *Methylocystis*. Por último, a la clase *Verrucomicrobia* pertenece el género *Methylacidiphilum* [31][23].

Además de la clasificación filogenética, los metanótrofos suelen dividirse teniendo en cuenta la presencia de su enzima más esencial, la metano monooxigenasa (MMO), que se encarga de oxidar el metano a metanol. Esta enzima puede diferenciarse en dos grupos: la MMO particulada (pMMO), que se encuentran en la membrana citoplasmática y la MMO soluble (sMMO), presente en el citoplasma. La sMMO utiliza $\text{NADH} + \text{H}^+$ como donador de electrones, además tiene un sitio catalítico para el hierro. Esta enzima se ve regulada por la presencia de cobre (Cu^{2+}) y es inhibida con altas concentraciones de éste. Las sMMO han sido encontradas en metanótrofos de tipo II y tipo X [4][22][32], aunque recientemente se ha encontrado que los de tipo I también son capaces de sintetizarlas [33]. Las pMMOs necesitan hierro y cobre para ser catalíticamente activas. En este caso, la alta presencia de Cu^{2+} las favorece, pudiendo aparecer en cualquier tipo de metanótrofo que crezca en

presencia de este compuesto con una concentración mayor a $0.8 \mu\text{M}$ [34][35][4][25]. Además, la presencia de un tipo u otro de monooxigenasa viene dado por las diferencias de concentración de oxígeno y metano que hay en el entorno de la bacteria. De este modo, una alta concentración de metano y baja concentración de oxígeno favorece la presencia de metanótrofos de tipo II, mientras que, en el caso contrario, favorece la presencia de los de tipo I [25]. Una vez obtenido el metanol por las sMMO, el siguiente paso de la ruta metabólica es la bio-conversión de metanol a formaldehído (Figura 4). En este paso entran en juego las enzimas metanol deshidrogenasas [4][22]. El formaldehído es transformado a ácido fórmico por acción de las enzimas formaldehído deshidrogenasas o a biomasa a través de las rutas RuMP, o a través de la ruta de la serina [22].

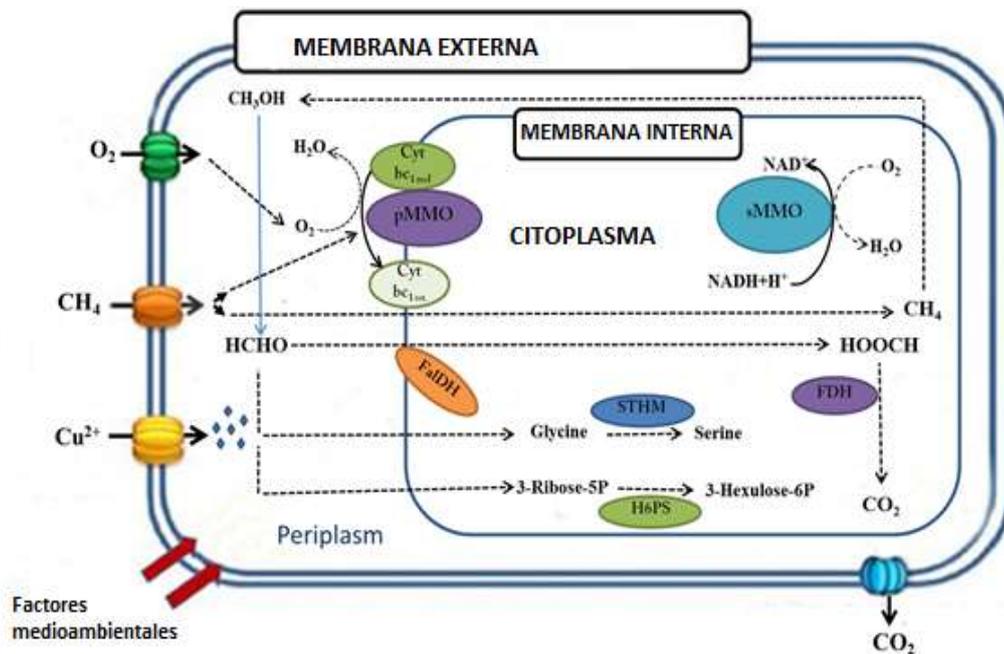


Figura 4: Rutas de oxidación del metano para metanótrofos tipo I y II. sMMO, metano monooxigenasa soluble; pMMO, metano monooxigenasa particulada; MDH, metanol deshidrogenasa; FDH, formiato deshidrogenasa; FALDH, formaldehído deshidrogenasa; cyt red/ox citocromo reducido / oxidado; STHM, serina hidroximetiltransferasa; H6PS, sintasa hexulosa-6-fosfato. Las líneas continuas hacen referencia a un flujo unidireccional en la ruta, mientras que las discontinuas representan rutas alternativas [4][32].

Los factores ambientales más relevantes para el crecimiento de los metanótrofos son la temperatura, el pH, así como los nutrientes presentes en el medio de crecimiento (ya sean macronutrientes o elementos traza). Las condiciones óptimas para el crecimiento de la mayor parte de los metanótrofos, así como para la oxidación del metano, son un contenido de agua del 20 a 35%,

temperaturas entre 25 y 35°C, pH entre 7 y 7.65 (aunque también se han encontrado metanótrofos en ambientes alcalinos con pHs alrededor de 9 y otros en medios ácidos con pHs por debajo de 7) [4][36][37], concentraciones de amonio bajas entre 12 y 61 μM [38] ya que compite con la MMO por el sitio de unión al metano, y concentraciones de cobre superiores a 0,86 $\mu\text{mol Cu}^{2+}$ g biomasa⁻¹, que aumentan la expresión de pMMO, potenciando la biodegradación de CH₄ en metanótrofos de tipo I [35][23].

1.4 Bioconversión de metano a productos de alto valor añadido

Los metanótrofos son capaces de catalizar un gran número de biotransformaciones, por ello han adquirido una gran importancia en el campo de la biorremediación (principalmente de metales pesados), así como en el área biotecnológico de síntesis de sustancias de alto valor comercial [39][25][24]. Dentro de este campo, los principales compuestos que se han empezado a producir a partir de organismos metanótrofos son [24]:

- Osmoprotectores internos como la ectoína [25], que tienen un importante valor farmacéutico por su carácter antioxidante y estabilizador de los componentes celulares.
- Biopolímeros
 1. Polímeros de almacenamiento interno: polihidroxialcanoatos. Son polímeros de almacenamiento bacterianos intensamente investigados por su potencial como sustitutos de los plásticos derivados de la industria del petróleo.
 2. Polisacáridos extracelulares o exopolisacáridos: las propiedades coloidales y adhesivas de los polisacáridos extracelulares y sus efectos sobre la reología de los líquidos hacen que se utilicen en las industrias de alimentos y productos no alimentarios tales como las industrias farmacéuticas, textil y del petróleo.
- Lípidos para la producción de biodiesel o como suplementos para la salud humana (reducción del colesterol).
- Productos metabólicos solubles como metanol, formaldehído y ácidos orgánicos.
- Óxido de propileno por catálisis de la célula entera (la amplia gama de sustratos para las MMO permite a las enzimas degradar los contaminantes del suelo, generar productos como 1- y 2-alcoholes de los C1-

C8 n-alcenos, 1,2-epóxidos de los alquenos terminales y etanol / etanal del éter dietílico).

- Vitamina B12.
- Single-Cell Protein: proteína utilizada tanto para alimentación animal como humana.

1.4.1 Ectoína

La ectoína (ácido 2-metil-1,4,5,6-tetrahidro-4-pirimidinocarboxílico) cuya estructura molecular se representa en la Figura 5, es un compuesto soluble en agua que tiene bajo peso molecular. Proporciona equilibrio osmótico a un gran número de bacterias halotolerantes, sin intervenir en sus procesos esenciales y el metabolismo celular [1][40]. Además, es uno de los productos sintetizados por microorganismos más valiosos, ya que es un estabilizante de enzimas, complejos de ADN-proteína y ácidos nucleicos.

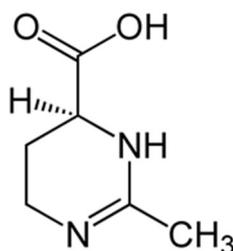


Figura 5. Estructura molecular de la ectoína

La ectoína tiene un valor importante en la industria farmacéutica, su precio en venta es de aproximadamente \$1000 kg⁻¹ y su consumo global representa 15000 t año⁻¹ [24][12]. En las últimas dos décadas, la producción de ectoína mediante procesos bacteriológicos está recibiendo especial atención, debido a que se consigue una síntesis más específica que con procesos químicos y es más rentable económicamente [40]. Actualmente, este compuesto solamente es producido industrialmente por la bacteria *Halomonas elongata*. Esta cepa puede reutilizarse hasta 9 veces en la producción de ectoína, tiene alta tolerancia a la sal y puede sintetizar ectoína eficazmente y excretarla al medio por choque osmótico. Sin embargo, su cultivo está limitado por el alto requerimiento de oxígeno, carbono y los efectos corrosivos de las altas concentraciones de sal utilizadas (12%) [41][42].

En el campo del tratamiento de metano, el grupo de Khemelenina y col. aislaron y caracterizaron en 1997 la primera cepa halotolerante metanotrófica alcalófila en los lagos de sosa de Tuva en Asia Central, *Methylobacterium*

alcaliphilum 20Z. Estudios posteriores demostraron que esta bacteria era capaz de expresar las tres enzimas específicas en la vía de la síntesis de ectoína de otras bacterias heterotróficas halotolerantes (EctA, EctB y EctC) (Figura 6) y que las condiciones ambientales eran cruciales para la expresión de dichas enzimas [43][44]. Sin embargo, hasta el año 2014 este organismo sólo fue estudiado genéticamente. Debido al alto interés que tiene la producción de este compuesto vinculada a la degradación de metano, el equipo de Muñoz y col. comenzó en 2015 una línea de investigación basada en la producción de ectoína a partir de emisiones difusas de metano, donde por primera vez se demostraba que era posible la producción de ectoína a partir de metano en biorreactores inoculados con *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z. Hasta ahora, esta investigación ha demostrado las condiciones operacionales y ambientales más favorables para la producción de esta sustancia y ha comprobado que era posible producir dicha molécula en biorreactores operados en continuo inoculados con *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z [1][6].

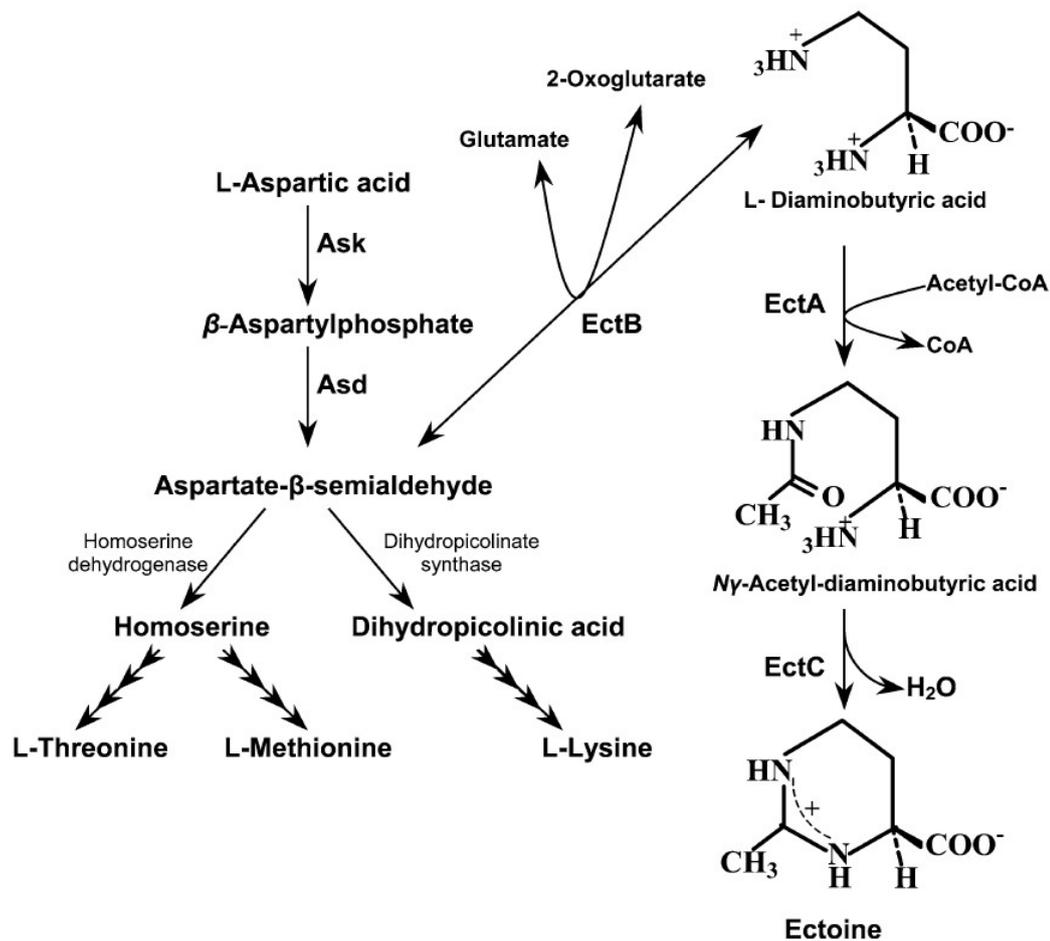


Figura 6. Ruta metabólica de la biosíntesis de la ectoína en *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z [45].

1.4.2 Bioplásticos

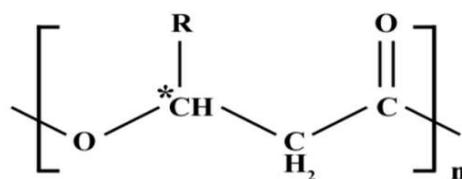
Otro producto de alto valor añadido producido por metanótrofos son los polihidroxicanoatos (PHAs), se trata de compuestos de la familia de los biopolíesteres, sintetizados por un gran número de microorganismos. Cada molécula de PHA se forma por unos 600 hasta 35000 radicales de ácidos grasos hidroxilados (Figura 7). Esta molécula proporciona a los microorganismos protección frente a situaciones de estrés ambiental, como son una mayor tolerancia frente al calor, luz UV y choques osmóticos. Además, los PHAs sirven como fuente de carbono y energía a los microorganismos en condiciones de ayuna. La ruta de producción de PHAs por metanótrofos ha sido estudiada y sigue tres pasos secuenciales: (1) el metano es introducido dentro de la célula, (2) dicho metano es transformado a hidroxialcil (HA) coA tioéster, y (3) se forma a partir de monómeros de HA por polimerización el biopolímero (PHAs) con enlaces éster [46][47][48][49] (Figura 8).

El interés comercial de este bioproducto reside en su potencial para sustituir el plástico convencional producido a partir de combustibles, (principalmente el polietileno y el polipropileno), ya que es biocompatible, biodegradable y posee buenas propiedades mecánicas [50][51]. Desde hace 40 años, empresas involucradas en I+D tales como *Metabolix*, *Biomer*, *ICI* o *Jiangmen Biotech Center* se han centrado en la producción a escala industrial de polihidroxicanoatos, principalmente en la obtención de PHB (polihidroxibutirato) y los copolímeros de poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), poli (3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) (P₃HB₄HB) y poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (PHBHx). Dichas producciones a gran escala han conseguido acumulaciones de PHAs entre 50 y 90 % del peso seco celular, productividades entre 400 a 2500 g PHAs m⁻³ h⁻¹, así como un coste de producción entre 4 a 20 € kg PHAs⁻¹ dependiendo del tipo de biopolímero obtenido, de la cepa microbiana utilizada, de la fuente de carbono y de la pureza obtenida en el producto [52][53][54]. A pesar de que, durante los últimos 10 años, se ha estado estudiando el uso de nuevas materias primas con el fin de disminuir el precio de los bioplásticos, la producción de PHAs aún está limitada por el coste de la materia prima, que representa entre un 30 - 40% del coste total de producción [50][47][55].

En este contexto, las emisiones residuales de metano pueden ser una gran fuente para la producción de bioplásticos por metanótrofos, ya que el uso de este metano residual como fuente de carbono implicaría una disminución considerable en los costes de producción mientras que, al mismo tiempo, se reduciría el impacto medioambiental de las emisiones de gases de efecto invernadero [56][25].

Hasta el momento, se han producido bioplásticos con metanótrofos de tipo II a partir de la ruta de la serina, mostrada en la Figura 8 [15][53]. La capacidad

de las bacterias metanotróficas y metilotróficas para producir PHB se describió para varias cepas en 1970, en el trabajo realizado por Whittenbury y col [57], y ha sido de interés constante durante décadas [58][57][59][60]. Sin embargo, el PHA más producido ha sido el PHB, cuya aplicación en el mercado está aún bastante limitada por su baja estabilidad térmica y lenta cristalización. Por eso las investigaciones más recientes usando metanótrofos para la producción de bioplásticos se están centrando en la producción de copolímeros como los PHBV con propiedades industriales mejores [62][64]. En este contexto, la última investigación llevada a cabo por el equipo de Myung y col. (2016) ha conseguido obtener altas concentraciones de los copolímeros PHBV, P3HB4HB, poly(3-hydroxibutirato-co-6-hydroxihexanoato-co-4-hydroxibutirato) (P3HB6HHx4HB), usando metano y ácidos grasos como fuentes de carbono.



Poly(3-hydroxyalkanoate)

R group	Carbon no.	PHA polymer
methyl	C ₄	Poly(3-hydroxybutyrate)
ethyl	C ₅	Poly(3-hydroxyvalerate)
propyl	C ₆	Poly(3-hydroxyhexanoate)
butyl	C ₇	Poly(3-hydroxyheptanoate)
pentyl	C ₈	Poly(3-hydroxyoctanoate)
hexyl	C ₉	Poly(3-hydroxynonanoate)
heptyl	C ₁₀	Poly(3-hydroxydecanoate)
octyl	C ₁₁	Poly(3-hydroxyundecanoate)
nonyl	C ₁₂	Poly(3-hydroxydodecanoate)
decyl	C ₁₃	Poly(3-hydroxytridecanoate)
undecyl	C ₁₄	Poly(3-hydroxytetradecanoate)
dodecyl	C ₁₅	Poly(3-hydroxypentadecanoate)
tridecyl	C ₁₆	Poly(3-hydroxyhexadecanoate)

Figura 7. Estructura molecular de los polihidroxiálcanoatos. La nomenclatura y el número de carbonos para los compuestos de PHA es determinado por el grupo funcional alquil -R. El asterisco denota el centro quiral del bloque a partir del cual se forma el PHA [64].

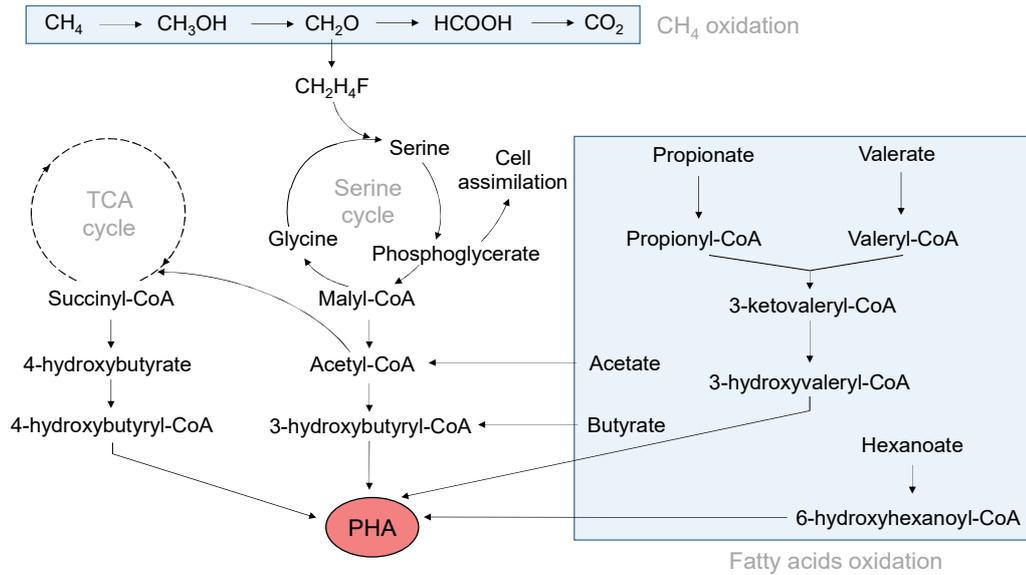


Figura 8. Ruta metabólica de producción de PHA en los metanótrofos de tipo II. Las flechas punteadas indican la existencia de intermedios no mencionados en la figura. Adaptado de [51][65][66].

1.4.3 Exopolisacáridos

La producción de exopolisacáridos o EPSs a partir células metanótrofas es otro de los objetivos de la presente investigación. Los exopolisacáridos forman un grupo compuesto por una amplia variedad de polisacáridos, proteínas, glicoproteínas y glicolípidos que son excretados al medio o bien quedan adheridos a la célula en forma de cápsulas como se puede ver en la Figura 9 [67][68][69].



Figura 9. Acumulación de exopolisacáridos alrededor del microorganismo *Escherichia coli* durante su crecimiento en placa [70].

Los microorganismos que poseen la capacidad de producir estos polisacáridos son de diferente naturaleza. Hasta ahora se conoce que ciertos microorganismos como las bacterias del ácido láctico (*Leuconostoc mesenteroides* o *Lactobacillus brevis*), cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Xanthomonas campestris* y algunos organismos eucariotas, como algas o levaduras, son capaces de producir EPSs [69][67][68]. Los exopolisacáridos son excretados por los microorganismos cuando se encuentran sometidos a altas relaciones C/N, o bien a agentes externos dañinos o estresantes. Estos exopolisacáridos intervienen naturalmente en la producción de biopelículas, constituyendo un entorno dinámico en el que las células bacterianas pueden alcanzar un estado de homeostasis y una óptima organización para hacer uso de todos los nutrientes disponibles, así como para protegerse frente sustancias nocivas [71][72][73].

Desde el punto de vista industrial, están tomando un gran interés por sus propiedades adhesivas y para formar coloides, además de los efectos que causan en la deformación de líquidos, usándose en la industria alimentaria, farmacéutica, textil y petrolera. La producción industrial de EPSs se basa principalmente en obtener polisacáridos a partir de microorganismos heterótrofos, como xantano ($4-13 \text{ Kg}^{-1}$), dextrano ($30-50 \text{ Kg}^{-1}$), hialuronano, alginato o gellan. Sin embargo, su producción aún está muy limitada, principalmente debido a los altos costes de los sustratos de carbono requeridos, así como a los elevados costes que se derivan de la purificación de los EPSs [74][72][25].

En este contexto, el metano podría usarse como fuente de carbono para la producción de EPSs. Hasta ahora, dicha producción se ha observado en metanótrofos de tipo I y II, demostrándose en varios estudios que la síntesis más rápida de EPSs ocurre en la ruta de la ribulosa monofosfato (RuMP) de metanótrofos de tipo I como *Methylomonas* y *Methylobacter* [75][76]. Sin embargo, algunos estudios afirman que la síntesis de EPSs podría afectar negativamente a las tasas de eliminación de metano, ya que su acumulación alrededor de los flóculos podría disminuir la difusión de este gas [76][77].

1.5 Perspectiva

Hasta ahora se conoce muy poco de la síntesis de sustancias de alto valor por metanótrofos, sin embargo, la bioconversión de las emisiones de metano a productos de alto valor industrial es **posiblemente la solución definitiva para combatir los efectos adversos de las emisiones diluidas de metano en el medio ambiente y la producción de sustancias biodegradables y ambientalmente respetuosas.**



A pesar de que se ha conseguido producir ectoína, PHAs y EPSs con metanótrofos, estos estudios aún son muy pioneros y no se han probado en la mayoría de los casos en biorreactores operando en continuo. Además, cabe destacar que nunca se ha probado una **producción conjunta de estas tres sustancias de alto valor en reactores para el tratamiento de metano** [12].

Por eso esta investigación se ha enfocado hacia dos vertientes diferentes: 1) tratar de aislar microorganismos metanótrofos novedosos capaces de producir ectoína combinado con la degradación de metano con el fin de encontrar cepas más eficientes en la producción de ectoína y degradación de metano y 2) producir ectoína, PHAs y EPSs en reactores biológicos a partir de *Methylo-microbium alcaliphilum* 20Z, así como a partir de un consorcio metanótrofo novedoso. De esta manera, se llevará a cabo por primera vez una evaluación sistemática de la viabilidad técnica y económica de una nueva generación de biorreactores basados en la bioconversión de metano a varias sustancias de alto valor económico, como son la ectoína, los PHAs, y los EPSs.



2.OBJETIVOS





La investigación planteada tubo como objetivos, por un lado: aislar metanótrofos novedosos procedentes de fuentes salinas y determinar sus condiciones óptimas de pH, temperatura y salinidad para su crecimiento y producción de ectoína. Por otro lado, determinar la importancia de las condiciones de operación, en concreto la influencia del magnesio, para la producción conjunta de sustancias de alto valor industrial (ectoína, PHAs y EPSs) a partir de emisiones diluidas de metano, operando dos biorreactores de columna de burbujeo inoculados, uno de ellos, con una cepa pura (*Methylophilum alcaliphilum* 20Z) y el otro con un consorcio metanótrofo novedoso.





3. MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 BIORREACTORES OPERADOS EN CONTINUO PARA LA ELIMINACIÓN DE CH₄ COMBINADA CON LA PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA, PHAs Y EPSs EN DIFERENTES CONDICIONES RESTRICTIVAS DE Mg²⁺.

3.1.1 Químicos y medio mineral salino

El medio mineral salino (MMS) usado en ambos reactores se preparó acorde a Kaluyzhnaya y col. (2008) con un pH final de 8.5 - 9.0.

Descripción del medio mineral salino:

NaCl	30 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.02 g
KNO ₃	1 g
Elementos traza	10 mL
Agua destilada tipo II	Enrasar a 1000 mL

Sales carbonato y buffer para la regulación del pH. Se añaden a 1 L de medio estéril a temperatura ambiente.

NaHCO ₃ (1M)	50.0 mL
Na ₂ CO ₃ (1M)	5.0 mL
Buffer fosfato	20.0 mL

Buffer fosfato:

KH ₂ PO ₄	7 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	15 g
Agua destilada tipo II	Enrasar a 500 mL

Solución de elementos traza:

EDTA	5.00 g
CuCl ₂ · 5H ₂ O	0.10 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.00 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.10 g
NiCl ₂ · 6H ₂ O	0.02 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.20 g
Na ₂ MoO ₄	0.03 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.03 g
H ₃ BO ₃	0.03 g
Agua destilada tipo II	Enrasar a 1000 mL

Todo el material, el medio y las sales se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1.2 atm durante 20 minutos. Las sales se esterilizaron por separado del medio para evitar su precipitación y fueron añadidas cuando el medio alcanzó una temperatura inferior a 40 °C. El pH se llevó a 9 para obtener un medio alcalino a partir de la adición de las sales de carbonato y el buffer fosfato.

3.1.2 Inóculos utilizados

Se usaron dos inóculos de diferente naturaleza, uno para cada reactor:

1. Un reactor (R1) se inoculó con una cepa pura, consistente en *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z, comprada en DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Leibniz-Institut) para uso académico. Se trata de un organismo metanótrofo de tipo I, halófilo, alcalino tolerante y capaz de sintetizar ectoína en presencia de NaCl [79]. Fue comprado como un cultivo líquido concentrado estéril que se conservó en tubos eppendorf de 1 mL con un 30% de glicerol a - 80 °C.
2. El otro reactor (R2) se inoculó con un consorcio de metanótrofos enriquecido por el grupo de Muñoz y col. al 6% de NaCl y 10 % CH₄ (v/v) durante 7 ciclos de crecimiento, el cual fue posteriormente caracterizado por la técnica de clonaje en la Universidad de Wageningen (Holanda). Este inóculo se estaba conformado principalmente por los órdenes: *Xhantomonadales* (62.5 %), *Caulobacteriales* (12.5 %), *Rhodobacterales* (6.6 %), *Sphingobacteriales* (2.5 %), *Rhizobiales* (2.5 %), *Tiotrichales* (2.5 %), *Rhodotermales* (0.8 %), *Methylococcales* (1.7 %) y bacterias no clasificadas (8.4 %).

En la preparación de los cultivos para inocular los reactores se usaron botellas de 1200 mL estériles cerradas con septum de butilo estancos para gases y tapas de rosca. Se añadió MMS hasta un volumen de 190 mL y 10 mL de inóculo (5 % (v/v)) a cada botella. Parte del aire del espacio de cabezas de cada botella fue reemplazado por metano (para alcanzar aproximadamente 50% v/v). El crecimiento se realizó en una incubadora a 25 °C y 200 rpm hasta obtener una absorbancia de 0.2 (medida por densidad óptica (DO)).

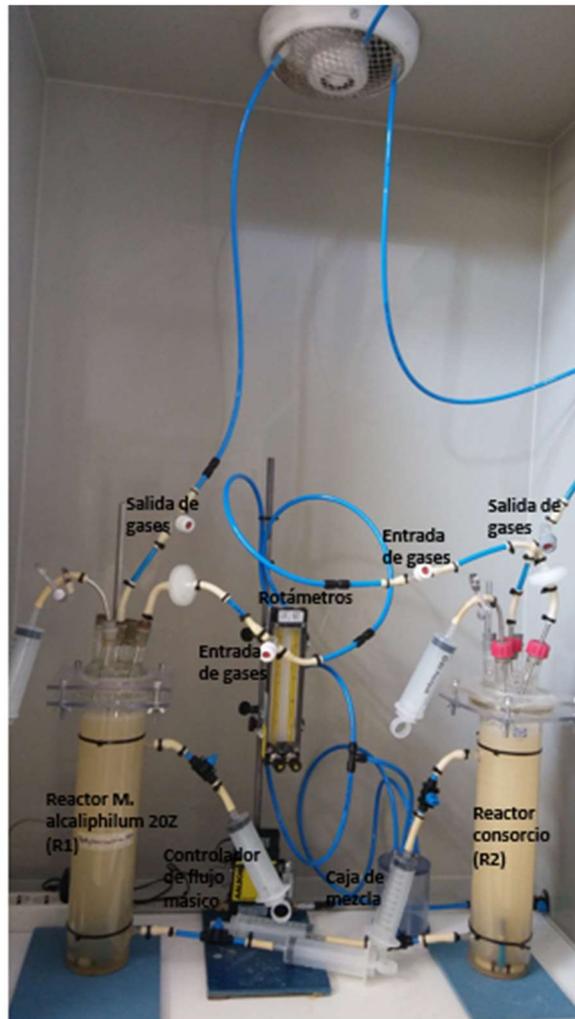


Figura 10. Instalación de dos reactores de burbujeo utilizada en el presente estudio.

3.1.3 Operación con diferentes condiciones de Mg^{2+}

Como se puede ver en la Figura 10, se operaron dos biorreactores de columna de burbujeo en continuo y mezcla perfecta de 2.5 L (Afora S.A., España). La corriente gaseosa de alimentación usada fue de 4% de CH_4 (concentración típica encontrada en vertederos, minas de carbón, tanques de almacenamiento de estiércol y explotaciones de ganado vacuno y por debajo del límite de explosividad [80]). El flujo se fijó con el rotámetro de la Figura 10 en 47 mL min^{-1} para el reactor del consorcio (R2) y 50 mL min^{-1} para el reactor de *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z (R1). Estos flujos fueron inicialmente diferentes para compensar las diferentes presiones de los tanques y conseguir el mismo tiempo de residencia de gas (30 min). El metano se introdujo junto con el aire en los reactores a través de difusores de acero inoxidable porosos de $10 \mu\text{m}$ de poro situados en el fondo de cada reactor. La corriente de ali-

mentación se obtuvo por la mezcla, en una cámara de mezcla de gases, de una corriente de CH₄ puro procedente de la línea de metano del laboratorio (desde una bombona) y controlado por medio de un controlador de flujo másico (Aalborg, EEUU) y aire. Este flujo y este volumen de reactor dieron como resultado un tiempo de residencia de aproximadamente 30 minutos. La homogenización del gas y la biomasa en el líquido se consiguió a través de las propias burbujas de gas. La temperatura se mantuvo a 25 °C durante todo el experimento. Para el seguimiento del reactor se midieron periódicamente las concentraciones de los gases (CH₄, CO₂ y O₂) tanto a la entrada como a la salida de ambos reactores.

El intercambio de líquido de cada biorreactor se realizó de manera manual a través de la extracción de 200 mL de caldo de cultivo de cada bio-reactor con una jeringa de 100 mL desde el tubo toma-muestras (Figura 10) y la devolución 200 mL de MMS fresco a cada reactor, de modo que se renuevan los micronutrientes, se mantiene el nivel de líquido dentro del reactor y se evita la variación del pH dentro del reactor por evaporación de agua y precipitación de las sales. Esos 200 mL extraídos de caldo de cultivo se usaron para realizar análisis de sólidos suspendidos totales (SST) (10 mL), determinar el pH (60 mL), determinar ectoína intracelular y ectoína extracelular (10mL), y determinar concentración de PHAs (2 mL).

La diferencia entre el modo de operación de ambas condiciones se basó en reducir 10 veces la cantidad de magnesio en el MMS, siendo en la primera condición de 0.2 g L⁻¹ y en la segunda 0.02 g L⁻¹ de Mg²⁺.

Tabla 1: condiciones de operación en cada reactor durante la condición 1

	R1	R2
Flujo de gas (mL min ⁻¹)	47	50
% CH ₄ [17]	4	4
Mg ²⁺ (g L ⁻¹)	0.2	0.2
%NaCl [1]	6	6
T ^a (°C) [1]	25	25

Tabla 2: condiciones de operación en cada reactor durante la condición 2

	R1	R2
Flujo de gas (mL min ⁻¹)	47	50
% CH ₄ [17]	4	4
Mg ²⁺ (g L ⁻¹)	0.02	0.02
%NaCl [1]	6	6
T ^a (°C) [1]	25	25

3.2 ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE NUEVOS METANÓTROFOS CAPACES DE PRODUCIR ECTOINA

3.2.1 Enriquecimiento y estudios poblacionales previos

Previamente a este proyecto de investigación, se llevaron a cabo enriquecimientos de nuevos metanótrofos halotolerantes y alcalófilos. Para ello, inóculos de varias fuentes alcalinas y salinas se enriquecieron añadiendo metano como única fuente de carbono. Después de 6 meses de enriquecimiento, las comunidades obtenidas se estudiaron mediante la técnica de clonaje y los resultados obtenidos mostraron:

- Enriquecimientos al 3 % NaCl: Este enriquecimiento se conformaba principalmente por los órdenes: *Thiotricales* (46.7 %), *Methyloccocales* (15.6 %), *Alteromonadales* (14.0%), *Flavobacteriales* (7.8 %) y bacterias no clasificadas (15.9 %).
- Enriquecimiento al 6 % NaCl: Este enriquecimiento se conformaba principalmente por los órdenes: *Xhantomonadales* (62.5 %), *Caulobacterales* (12.5 %), *Rhodobacterales* (6.6 %), *Sphingobacteriales* (2.5 %), *Rhizobiales* (2.5 %), *Tiotrichales* (2.5 %), *Rhodotermales* (0.8 %), *Methyloccocales* (1.7 %) y bacterias no clasificadas (8.4 %).

3.2.2 Químicos y medio mineral salino usado en los experimentos de aislamiento

El medio utilizado en todos los casos fue el medio de Kalyuznaya y col. (2008) mencionado en el apartado anterior, pero en este caso se añadió una solución de vitaminas concentrada, para fomentar el crecimiento de aquellos microorganismos que carecieran de la ruta enzimática de ciertos aminoácidos, así como una aportación extra de calcio (solución 3B) necesaria para el crecimiento de muchos microorganismos [4]. Para las botellas de pH=9 y 10 se añadieron 3.4 mL de una solución preparada de sales esterilizadas descritas

en el apartado anterior (50 mL de NaHCO_3 , 5 mL de Na_2CO_3 y 20 mL de buffer de fosfato) que actuaba de buffer fosfato/carbonato. Para el ajuste de pH de las botellas se añadieron 550 μL de NaOH estéril a 50 mL de solución pH 7 para conseguir pH 8, y 750 μL de NaOH estéril a 50 mL de solución pH 9 para conseguir pH 10.

Solución 3B	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11g
	Agua destilada tipo II	Enrasar a 1000mL

Solución de vitaminas:

Biotina	20 mg
Nicotinamida	200 mg
Ácido para-aminobenzoico	100 mg
Ácido pantoténico	100 mg
Agua destilada tipo II	Enrasar a 318 mL

3.2.3 Aislamiento y selección de nuevos microorganismos

Para el aislamiento de nuevos microorganismos las poblaciones crecidas al 3 y 6 % de NaCl se cultivaron en placas por el método de extensión en placa con asa de Digarlski, por el cual las muestras diluidas se sembraron directamente en la superficie de placas Petri en las que previamente se había añadido MMS al 6 % NaCl con 15 % (g/v) de agar bacteriológico. Las placas se incubaron con 10 % de metano en una cámara de crecimiento durante 20 días. Tras el crecimiento se llevó a cabo el picado de colonias, por el cual las colonias crecidas se introdujeron en 400 tubos de ensayo con MMS y CH_4 y se crecieron. Las colonias crecidas en tubos de ensayo capaces de degradar metano y producir ectoína se seleccionaron para este estudio.

3.2.4 Purificación de aislados

Las colonias capaces de degradar metano y producir ectoína se cultivaron en placas de Petri (6 % NaCl y agar (15% v/v)) por la técnica de estriado (Figura 11) con el objetivo de conseguir colonias puras. Dichas placas se incubaron en una cámara de crecimiento con un 10 % de CH_4 durante 15 días y posteriormente se procedió al picado de colonias. Éstas se introdujeron en botellas estériles de 120 mL con MMS 6 % NaCl y CH_4 (10 % v/v) selladas con septum de butilo para gases y tapas de aluminio y se dejaron crecer durante 30 días. Se controlaron los niveles de oxígeno, metano y dióxido de carbono en el espacio de cabezas de las botellas después de inocularlas mediante la toma de

muestras de gases con jeringas herméticas de gases y su medición en un cromatógrafo de gases GC-TCD.

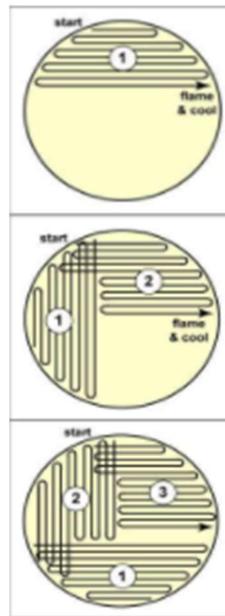


Figura 11. Cultivo por estriado [81]

Para caracterizar cada colonia crecida se concentró la biomasa 5 veces y se extrajo el ADN de cada colonia utilizando el protocolo descrito en el manual de *Fast DNA Spin Kit para Soil* (MP Biomedicals, LLC). Los genes de 16S rRNA bacterianos se amplificaron completamente (1452 pb) mediante la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 27-F y 1492-R (Anexo III.II). La mezcla de PCR (50 μ L) contenía 2 μ L de cada cebador, 25 μ L de mezcla de reacción BIOMIX Biotium (USA) (Anexo III.I), 2 μ L del ADN extraído y agua Milli-Q hasta el volumen final. La PCR se realizó en un termociclador iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) con el siguiente programa de termociclaje para la amplificación bacteriana: 1 ciclo de 5 minutos de acondicionamiento a 94 °C, 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, 30 ciclos de unión de los cebadores a 52 °C durante 1 minuto, 30 ciclos de polimerización a 72 °C durante 3 minutos y 1 ciclo de polimerización final a 72 °C durante 5 minutos. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa (1%) (90 v, 50 MIN) en la que se tiñó dicho gel por adición del tinte específico de ácidos nucleicos GelRed (Biotium, USA). Las bandas específicas de PCR se detectaron mediante un transiluminador de longitud de onda ultravioleta 254 – 312 nm (Sigma – Aldrich, USA). Para confirmar la pureza de los aislados por secuenciación sanger de las bases del ADN del ARNr 16S de bacteria se enviaron a Secugen S.L (Madrid) las muestras de ADN de cada aislado.

Periódicamente, además, se hicieron PCRs en el laboratorio para amplificar el ADN de los microorganismos y sucesivamente corroborar por secuenciación la pureza de los aislados mediante secuenciación sanger de alta pureza (Secugen S.L (Madrid)).

3.2.5 Caracterización de nuevos aislados metanótrofos.

Para caracterizar los aislados obtenidos se llevaron a cabo estudios de optimización de temperatura, pH, salinidad y una prueba para determinar las fuentes de carbono usadas por dichos aislados (DAPI 50).

- **Experimento en lote para optimizar el pH, temperatura y salinidad de crecimiento de los nuevos aislados metanótrofos**

Se llevaron a cabo 3 ensayos diferentes, un ensayo de optimización de temperatura (25, 30 y 37 °C), un segundo ensayo de optimización de pH (7, 8, 9 y 10), un tercer ensayo de halotolerancia (3% y 6% de NaCl). Para ello, en botellas de 120 mL (2x réplicas) se adicionaron 50 mL de MSM, se cerraron las botellas con septum de butilo y tapas y se añadió metano en el espacio de cabezas con una jeringa hermética para gases (10% v/v). Las botellas se esterilizaron a 121 °C y 1.2 atm durante 20 minutos. Posteriormente, se inocularon los aislados en condiciones estériles. Todas las botellas se mantuvieron en agitación a 200 rpm a sus temperaturas de crecimiento correspondientes y se midieron los gases CH₄, CO₂ y O₂ periódicamente en un GC-TCD con jeringas estériles, exclusivas para cada aislado. A través de esto se obtuvieron tasas de eliminación de metano y se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento de cada aislado, así como la producción de ectoína.

- **Prueba API 50CH y API 20A**

Para la determinación de caracteres fenotípicos y de la actividad enzimática de los diferentes aislamientos bacterianos también se usó un sistema estandarizado de identificación API 50 CH, un sistema para el Estudio de la Fermentación de 49 Azúcares y el sistema API 20 A que permite estudiar rápida y fácilmente 21 caracteres destinados a la identificación bioquímica de las bacterias anaerobias. Una vez se alcanzó suficiente biomasa activa, los biotipos bacterianos de los aislados se determinaron siguiendo el protocolo de ambas pruebas bioquímicas. Para ello cada cepa específica se resuspendió en el medio de cada prueba estandarizada y se procedió a la inoculación de las galerías añadiendo 100 µL de la suspensión (evitando la formación de burbujas y el rebose del tubo) en cada tubo para el test específico. Se cerró cada cámara de incubación y se colocaron a la temperatura óptima de crecimiento de cada bacteria, anotando los resultados pasadas 24, 48, 72 y 96 h. En el

caso de la prueba API 20A para mantener una atmósfera anaerobia durante el experimento se selló cada tubo por adición de aceite de silicona 200 cSt.

3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1 Monitorización de las concentraciones de CO₂ y CH₄

Las concentraciones de CO₂, CH₄ y O₂, tanto en la corriente de entrada a cada reactor como en la de salida, se determinaron en un cromatógrafo de gases Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, EE.UU.) equipado con un CP-Molsieve 5A (15 m x 0.53 μm x 15 μm) y un CP-PoraBOND Q (25 m x 0.53 μm x 10 μm) de columna. Las temperaturas del horno, inyector y del detector se mantuvieron a 45 °C, 150 °C y 200 °C, respectivamente. Se utilizó helio como gas portador a 13.7 mL min⁻¹ [1].

Estos datos fueron utilizados en el experimento de los biorreactores de burbujeo en continuo para estudiar la capacidad de eliminación de CH₄ (CE, g h⁻¹m⁻³), la eficiencia de eliminación de CH₄ (EE, %) y la producción total de CO₂ (PT CO₂, g h⁻¹m⁻³), parámetros comúnmente utilizados en ensayos de reactores en continuo. La manera de determinar estos parámetros es la representada en las siguientes fórmulas [82]:

$$CE = \frac{([CH_4]_e - [CH_4]_s) \cdot Q}{V} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$EE = \frac{[CH_4]_e - [CH_4]_s}{[CH_4]_e} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$PT\ CO_2 = \frac{([CO_2]_e - [CO_2]_s) \cdot Q}{V} \quad \text{Ecuación 3}$$

3.3.2 Medida de SST

Los SST se midieron de acuerdo a los métodos estándar [83][1].

3.3.3 Análisis de ectoína intracelular

Para la determinación de la ectoína intracelular, se procedió a la rotura celular, tanto física como química, y a la solubilización de la ectoína en el medio de extracción. Para ello, 1.5 mL del caldo de cultivo se centrifugaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL a 9000 g y 4°C durante 15 minutos, tras lo cual se

desechó el sobrenadante y se añadieron 25 ± 5 mg de perlas de zirconia /sílice de 0.1 mm de diámetro (BioSpec, España) y 1.5 mL de etanol al 70%. Tras esto, las células bacterianas se rompieron en un Mini-BeadBeater-16 (BioSpec, España) durante 1 minuto, dejando la suspensión toda la noche a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 9000 g y 4°C durante 15 minutos. Posteriormente fue filtrada con filtros de $0.22 \mu\text{m}$ (Filter-lab, Barcelona) en viales de HPLC. La concentración de ectoína se determinó por HPLC-UV en un HPLC 717 plus con muestreo automático (Waters, Bellefonte, EEUU) acoplado con un Dual UV λ absorbancia detector (Waters, Bellefonte, detector EEUU) a 210 nm utilizando un AQ LC-18 + columna C Supelcosil (Waters, Bellefonte, EEUU) y un C18 AQ + pre-columna (Waters, Bellefonte, EEUU). Como fase móvil se utilizó un tampón de fosfato consistente en 0.1824 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 2.15 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 1 L de agua destilada tipo II, a 25°C y un caudal de 1 mL min^{-1} . La cuantificación de ectoína se llevó a cabo realizando una curva patrón con distintas concentraciones conocidas de ectoína pura (comprada en Sigma Aldrich, EEUU) y las áreas detectadas por el HPLC, además se determinaron los límites de detección y cuantificación considerando aceptables valores de ratio de señal y ruido de 2:1 y 10:1 respectivamente (el límite de detección es la menor concentración de sustancia a analizar que es capaz de detectar el equipo, mientras que el límite de cuantificación es la mínima concentración de sustancia a analizar para la cual el equipo da un resultado fiable teniendo en cuenta el ruido). La concentración de ectoína intracelular específica ($\text{mg ectoína g biomasa}^{-1}$) se calculó utilizando la concentración de SST (g L^{-1}) del caldo de cultivo correspondiente.

3.3.4 Análisis de ectoína extracelular

Para la determinación de la ectoína extracelular se filtraron 1.5 mL del caldo de cultivo con filtros de $0.22 \mu\text{m}$ (Filter-lab, Barcelona) en viales de HPLC. El equipo utilizado para analizar la ectoína es el mismo que el utilizado para el análisis de la ectoína intracelular [1].

3.3.5 Análisis de PHAs

Se detectaron PHAs a partir de 1.5 mL de muestra de caldo de cultivo, las cuales se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm, procesándose posteriormente según López y col. (2016) [84]. Los PHAs extraídos de las muestras se midieron en un GC-7820A unido a un MSD-5977E (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) y equipado con una columna de DB-cera ($30 \text{ m} \times 250 \mu\text{m} \times 0.25 \mu\text{m}$). Las temperaturas del detector y del inyector se mantuvieron a 250°C . La temperatura del horno se mantuvo inicialmente a 40°C durante 5 minutos, posteriormente se aumentó a razón de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta alcanzar 200°C y se mantuvo a esta temperatura durante 2 minutos. Finalmente, la temperatura del horno se incrementó hasta 240°C a una velocidad de 5°C min^{-1} . El contenido de PHA (% wt, g de PHA g SST^{-1}) de las muestras y

las fracciones de HB y HV de los PHA (% moles) eran referidos a la concentración inicial de biomasa de la muestra.

3.3.6 Análisis de EPSs

Para determinar la presencia de exopolisacáridos se pesaron eppendorf de 2 mL (previamente secados en estufa a 55 °C). A dichos eppendorf se añadió 0.5 mL del sobrenadante obtenido tras centrifugar 2 mL de caldo de cultivo a 9000 g durante 15 minutos (en duplicado) y 1.5 mL de etanol (70 % v/v) con el fin de precipitar los EPSs. Esta mezcla se dejó reposar 24 horas, se centrifugó (10000 rpm durante 20 minutos) y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente se procedió a la evaporación del líquido sobrante y secado completo del eppendorf durante 24 horas a 55 °C en estufa, tras lo cual, pasado ese tiempo, se procedió al pesado de dichos eppendorf.

3.3.5 Tratamiento de datos

Los errores típicos de las muestras se han calculado como la desviación estándar de las repeticiones.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{N}}$$

Ecuación 4





4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 BIORREACTORES OPERADOS EN CONTINUO PARA LA ELIMINACIÓN DE CH₄ COMBINADA CON LA PRODUCCIÓN DE ECTOÍNA, PHA Y EPSs EN DIFERENTES CONDICIONES RESTRICTIVAS DE Mg²⁺.

El objetivo de esta parte de la investigación fue determinar la degradación de metano unida a la producción en estado estacionario de ectoína intracelular y extracelular, EPSs y PHAs por microorganismos metanótrofos (se consideró estado estacionario cuando las medias de las eliminaciones de degradación variaban menos de un 2 %). Además, con el fin de optimizar la producción de dichos compuestos se usaron diferentes condiciones de operación basadas en la modificación de la concentración de un nutriente esencial, en este caso el magnesio. Para ello se operaron dos reactores de columna por burbujeo con un 6% de NaCl, e inoculados uno de ellos con *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z (R1) y otro con un consorcio de bacterias (R2).

4.1.1 Producción de ectoína intracelular y extracelular

Durante la condición de operación con 0.2 g Mg²⁺ L⁻¹ (condición 1) la producción de ectoína en estado estacionario se muestra en la Figura 12. Los valores medios de ectoína intracelular mostraron diferencias significativas entre ambos reactores, siendo en R1 de 94.5 ± 18.2 mg ectoína g biomasa⁻¹, mientras que en R2 se detectó una producción media de ectoína de 73.2 ± 6.3mg ectoína g biomasa⁻¹.

La producción de ectoína intracelular media durante la operación de ambos reactores con una concentración de Mg²⁺ de 0.02 g L⁻¹ (condición 2) se muestra en la Figura 12. En este caso, se detectó una producción de ectoína intracelular de 53.02 ± 13.7 mg ectoína g biomasa⁻¹ en R1, mientras que R2 alcanzó valores de 55.9 ± 11.2 mg ectoína g biomasa⁻¹, no observándose una diferencia significativa en dicha producción.

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z produce mayores concentraciones de ectoína que el consorcio en condiciones óptimas de nutrientes. Además, los valores de ectoína intracelular obtenidos en la condición 2 fueron menores que en la condición 1, independientemente del cultivo utilizado, probablemente debido al importante papel del magnesio en la ruta metabólica de la producción de ectoína [40]. Es de destacar que los valores de ectoína intracelular obtenidos en este estudio en ambos reactores fueron superiores en todos los casos a los obtenidos en estudios previos llevados en continuo en tanques agitados de mezcla perfecta inoculados con *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z [12], donde los valores de ectoína alcanzados fueron de 37.4 ± 3.8 mg de ectoína g biomasa⁻¹ (empleando 4% de

CH₄, 25 °C, 6% de NaCl, 50 μM de Cu²⁺ y una agitación de 300 rpm). Esta diferencia posiblemente se deba al estrés mecánico causado por los tanques de mezcla perfecta en comparación con los reactores de columna por burbujeo usados en este estudio, que parecen más apropiados para el crecimiento de *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z.

Otros estudios realizados de producción de ectoína con bacterias heterótrofas han mostrado producciones de hasta 160 mg de ectoína g biomasa⁻¹ con *Brevibacterium epidermis* (1M NaCl, extracto de levadura de glutamato sódico como fuente de carbono), 150 mg de ectoína g biomasa⁻¹ con *Brevibacterium* sp. (2M NaCl, extracto de levadura polipéptida como fuente de carbono) y valores de producción de ectoína de 155 mg de ectoína g biomasa⁻¹ usando *Halomonas elongata* (0.5M NaCl, utilizando como fuente de carbono glutamato sódico)[40]. A pesar de que los valores de producción de ectoína obtenidos por bacterias heterótrofas son mayores que los obtenidos hasta el momento por organismos metanótrofos, estos procesos poseen un alto coste debido a la fuente de carbono utilizada, así como a los altos niveles de oxígeno requeridos. En este contexto, la producción de ectoína por microorganismos metanótrofos ofrece la posibilidad de un nuevo concepto de biorrefinería procedente de una fuente de carbono gratuita y cuya eliminación beneficia al medio ambiente.

Durante el período de operación los análisis de ectoína extra-celular no revelaron existencia del subproducto en el caldo de cultivo. A pesar de que otros estudios han demostrado la producción de ectoína extracelular por *M. alcaliphilum* 20Z, parece ser que la excreción de ectoína por la célula al medio requiere de altas concentraciones de metales disueltos en el caldo de cultivo, especialmente de cobre (25μM) [12].

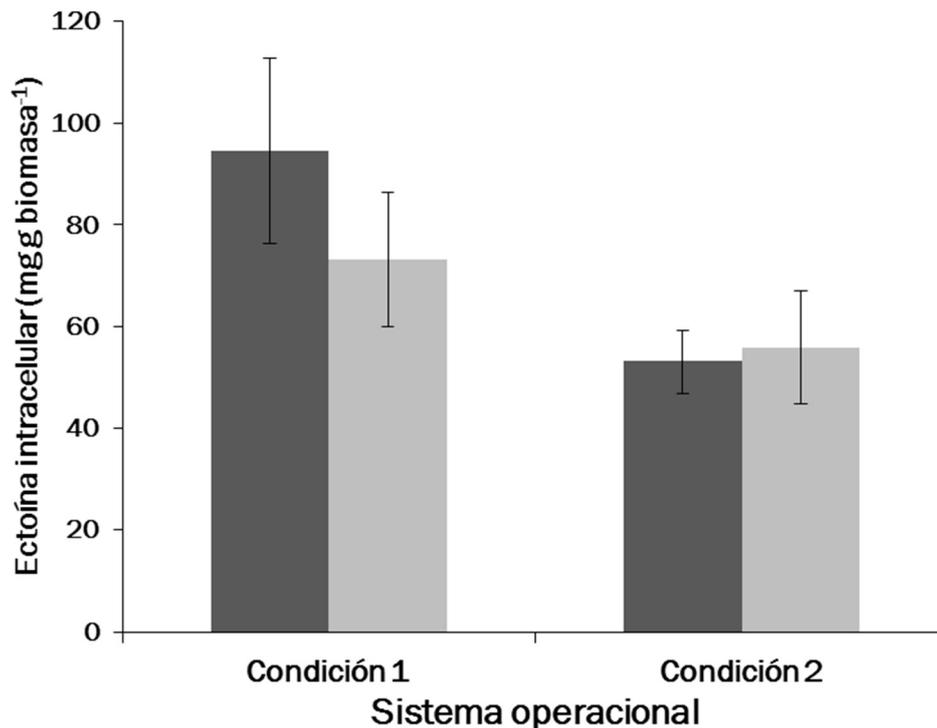


Figura 12. Producción de ectoína intracelular en estado estacionario en las diferentes condiciones de operación en el biorreactor *Methylomicrobium* (R1, gris oscuro) y en el biorreactor consorcio (R2, gris claro). Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

4.1.2 Producción de PHAs

Durante la primera condición de operación ($0.2 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$), la concentración de PHAs (PHB-PHV) media que se alcanzó en R1 tomó valores de $1.30 \pm 0.2 \text{ mg PHAs L}^{-1}$ ($1.08 \pm 0.3 \text{ mg PHB g biomasa}^{-1}$), mientras que en el reactor consorcio las concentraciones encontradas fueron estadísticamente superiores siendo $2.02 \pm 0.3 \text{ mg PHAs L}^{-1}$ ($1.44 \pm 0.3 \text{ mg PHAs g biomasa}^{-1}$). En condiciones restrictivas de magnesio ($0.02 \text{ g L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$), la concentración de PHAs media que se obtuvo en R1 fue $1.04 \pm 0.4 \text{ mg PHAs L}^{-1}$ ($0.62 \pm 0.1 \text{ mg PHAs g biomasa}^{-1}$), mientras que R2 alcanzó una concentración 2 veces mayor e igual a $2.56 \pm 0.5 \text{ mg PHAs L}^{-1}$ ($2.1 \pm 0.3 \text{ mg PHAs g biomasa}^{-1}$) (Figura 13). Independientemente de la concentración de magnesio utilizada, el consorcio produjo altas concentraciones de PHAs en comparación con las producidas por *M. alcaliphilum* 20Z. Una mayor producción de PHAs en el consorcio era de esperar teniendo en cuenta que se trata de una población mixta. Además, menores concentraciones de magnesio fomentaron la producción de más PHAs, ya que se tratan de formaciones biopoliméricas que aparecen cuando hay escasez de algún nutriente esencial en el medio [47][48].

En el caso de los PHVs, no se detectaron estos compuestos teniendo en cuenta los límites de detección del GC-masas.

La bacteria por excelencia utilizada en la industria para la producción de PHBs ha sido *Alcaligenes eutrophus* ya que es capaz de producir un 50 % en masa de PHBs de alto peso molecular. Otras bacterias como *Bhurkoldenia* (150 mg PHB g biomasa⁻¹), *Azotobacter vinelandii* (34.9 mg PHB g biomasa⁻¹) y *Pseudomonas sp.* (32 mg PHB g biomasa⁻¹) están tomando también una gran importancia en el mercado de los bioplásticos por sus altas producciones de PHBs de calidad [86]. En el caso de los metanótrofos, son los metanótrofos tipo II por excelencia los productores de PHBs, como es el caso de *Methylosinus trichosporium* con producciones de hasta un 40% g g⁻¹ y *Methylocystis sp.* con 51% g g⁻¹ bajo condiciones de limitación de nitrógeno [87].

A pesar de que los valores obtenidos en este estudio son menores que los hallados en estudios con otros metanótrofos, es importante destacar de esta investigación que por primera vez se ha mostrado producción de PHBs con metanótrofos no considerados de tipo II.

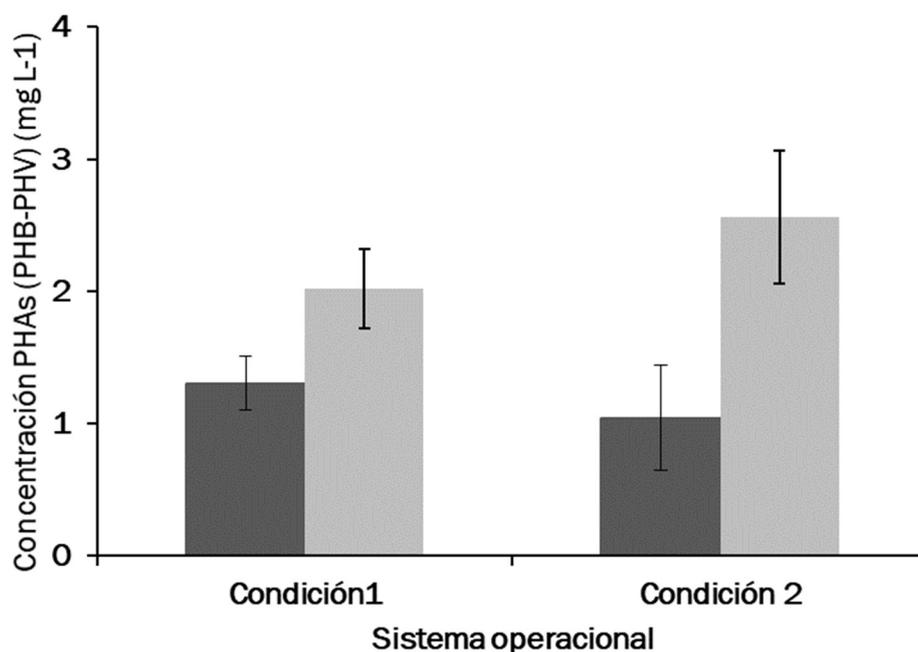


Figura 13: Concentraciones obtenidas de polihidroxialcanoatos en estado estacionario en las diferentes condiciones de operación en el biorreactor *Methylomicrobium* (R1, gris oscuro) y en el biorreactor consorcio (R2, gris claro). Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

4.1.3 Producción de EPS

La producción de exopolisacáridos que se observó en estado estacionario durante las dos condiciones de estudio se muestra en la Figura 14. La concentración media obtenida durante la primera condición de operación ($0.2 \text{ g Mg}^{2+} \text{ L}^{-1}$) en R1 fue $2150 \pm 357 \text{ mg L}^{-1}$, mientras que R2 alcanzó concentraciones en las mismas condiciones de $2300 \pm 608 \text{ mg L}^{-1}$. Los valores obtenidos de concentraciones en la operación con 0.02 g L^{-1} de magnesio en condiciones estacionarias fueron de $1320 \pm 467 \text{ mg L}^{-1}$ por R1 y, $1000 \pm 179 \text{ mg L}^{-1}$ por R2.

Como se muestra en la Figura 14, durante la segunda condición de operación (0.02 g L^{-1} de magnesio) en la que se suministró menos magnesio, las concentraciones alcanzadas en R2 fueron menores que las obtenidas durante la primera condición (0.2 g L^{-1} de magnesio), de modo que su producción se ve afectada por la presencia de magnesio en el medio. Estos resultados pueden atribuirse a que el Mg^{+2} interviene en procesos bioquímicos en las ruta de la producción y excreción de polisacáridos [88]. Investigaciones realizadas por Hernández y col. (2015), hallaron concentraciones de EPS de $5.2 \pm 2.5 \text{ mg L}^{-1}$ [89], mientras que Kiliç y col. (2008) obtuvieron producciones de 863.3 mg L^{-1} para *Pseudomonas aeruginosa* (pH=7, 96 horas de incubación, $50 \text{ mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$), 444.6 mg L^{-1} para *Micrococcus sp.* (pH=7, 72 horas de incubación, $100 \text{ mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$, $20 \text{ }^\circ\text{C}$) y 430.5 mg L^{-1} para *Ochrobactrum sp* (pH=8, 48 horas de incubación, $150 \text{ mg Cr}^{6+} \text{ L}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$) [90]. Los valores obtenidos en esta investigación son muy elevados respecto al resto de investigaciones. Teniendo en cuenta la alta concentración salina utilizada, el límite de detección del método de análisis de EPS fue de $600 \text{ mg EPS L}^{-1}$. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio nos sirven para confirmar la producción de EPSs en ambos reactores y para dilucidar la importancia del magnesio en su producción, pero no nos permite hacer un estudio cuantitativo y comparativo estadísticamente relevante.

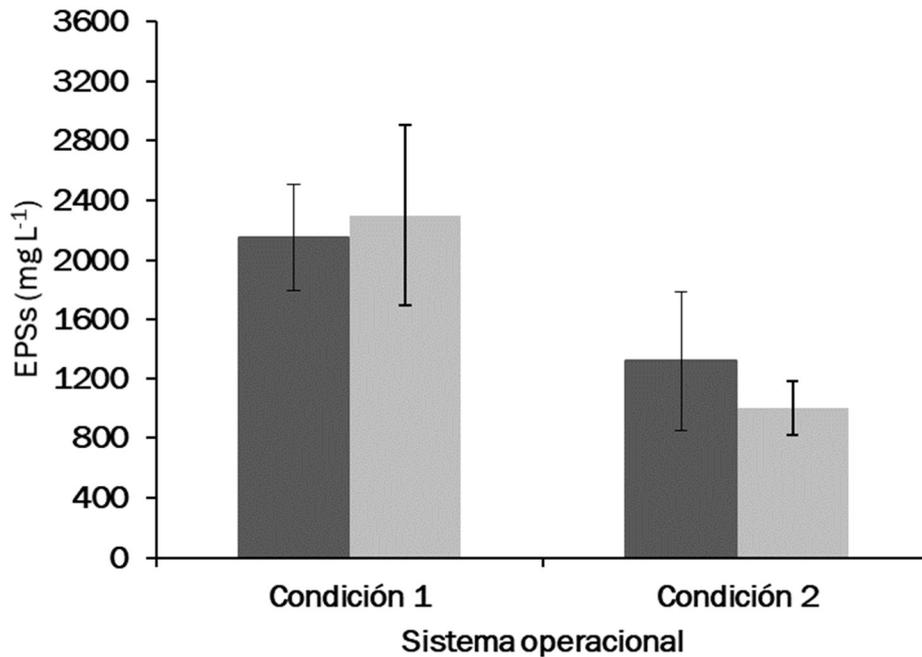


Figura 14: Concentraciones obtenidas de exopolisacáridos en estado estacionario en las diferentes condiciones de operación en el biorreactor *Methylomicrobium* (R1, gris oscuro) y en el biorreactor consorcio (R2, gris claro). Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

4.1.4 Parámetros operacionales

- *Capacidad de eliminación (CE) y producción de CO₂ (PTCO₂)*

La capacidad de eliminación de R1 fue de 16.01 ± 3.12 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ durante el estado estacionario trabajando con 0.2 g L⁻¹ de magnesio, mientras que la de R2 fue de 16.97 ± 1.36 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ en las mismas condiciones (Figura 15). Por otro lado, referida a la misma condición de operación anterior, la producción total de CO₂ de R1 fue de 37.15 ± 0.85 g CO₂ h⁻¹ m⁻³ y en el caso de R2 alcanzó valores de 33.68 ± 0.9 g CO₂ h⁻¹ m⁻³ (Figura 16)

En la segunda condición (0.02 g L⁻¹ Mg²⁺) se obtuvieron CE de 18.57 ± 2.99 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ y 15.15 ± 1.46 g CH₄ h⁻¹ m⁻³ en R1 y R2 respectivamente (Figura 15), mientras que la PTCO₂ fue de 27.22 ± 1.1 y 23.38 ± 1.3 g CO₂ h⁻¹ m⁻³ en ambos reactores (Figura 16).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el magnesio no pareció tener un papel determinante en las capacidades de eliminación del metano. A pesar de que se esperaba una mayor eliminación en R2 al aumentar la biodiversidad en los reactores, conllevando un aumento en la resiliencia, es decir, un aumento en

la capacidad de la población de absorber perturbaciones, los resultados obtenidos mostraron que no hubo diferencias significativas entre ambos reactores. Por otro lado, aunque la producción de CO_2 fue más alta en *M. alcaliphilum* 20Z, esto seguramente se deba a que la asimilación de carbono en el consorcio fue más focalizada hacia la producción de metabolitos secundarios (como PHAs y EPSs) y biomasa. En otros estudios realizados con *M. alcaliphilum* 20Z los valores de CE alcanzados fueron mucho menores que en esta investigación ($5.0 \pm 1.0 \text{ g CH}_4 \text{ h}^{-1} \text{ m}^{-3}$ (6 % NaCl, reactor de tanque agitado inoculado con *M. alcaliphilum* 20Z, con agitación 600 rpm y $0.05 \mu\text{M Cu}^{2+}$)). Estos resultados se deban seguramente al tipo de reactor utilizado y las altas tasas de agitación mecánica implementadas en estudios anteriores [12]. Es importante destacar que las producciones de CO_2 halladas en estos estudios anteriores son mayores que las que cabría esperar estequiométricamente con tales eliminaciones de metano, lo que demuestra que el metabolismo de *M. alcaliphilum* 20Z deriva una gran cantidad de carbono a la producción de CO_2 [80].

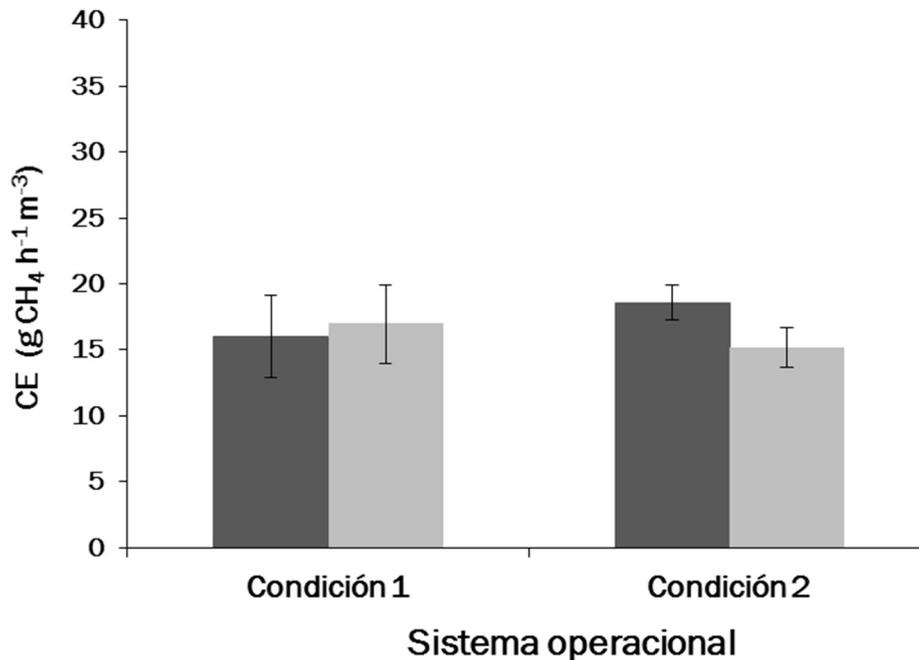


Figura 15: Capacidad media de eliminación de metano alcanzada en estado estacionario en las diferentes condiciones de operación en el biorreactor *Methylomicrobium* (R1, gris oscuro) y en el biorreactor consorcio (R2, gris claro). Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas.

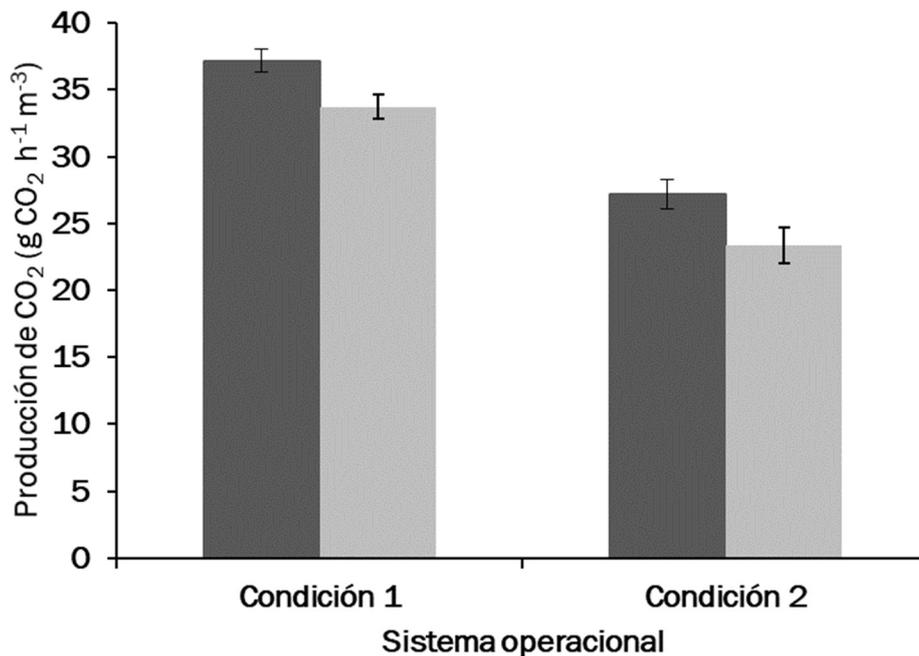


Figura 16: Producción media de CO₂ en estado estacionario en las diferentes condiciones de operación en el biorreactor *Methylomicrobium* (R1, gris oscuro) y en el biorreactor consorcio (R2, gris claro). Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas

- **Eficiencia de eliminación (EE)**

La Figura 17 representa la eficiencia de eliminación de cada biorreactor en cada condición de operación. Durante la operación con una concentración de 0.2 g L⁻¹ de magnesio, la EE media en R1 fue de 26.08 ± 5.00 % en estado estacionario, siendo de 26.95 ± 4.06 % en R2 en las mismas condiciones operacionales. Respecto a la segunda condición (0.02 gL⁻¹ de magnesio), el valor alcanzado de EE en R1 fue 31.22 ± 4.22 %, mientras que en R2 llegaron a tomarse valores medios en estado estacionario de 26.20 ± 2 %.

Al igual que en la CE, los valores de EE no mostraron diferencias significativas trabajando a diferentes concentraciones de magnesio.

La eficiencia de eliminación obtenida para ambos reactores, al igual que su capacidad de eliminación, no fue muy alta en comparación al 57 ± 1 % conseguido en reactores similares inoculados con metanótrofos [80]. Sin embargo, estos organismos son capaces de rentabilizar el proceso de degradación de metano al producir altas concentraciones de sustancias de alto valor añadido, principalmente ectoína y PHAs.

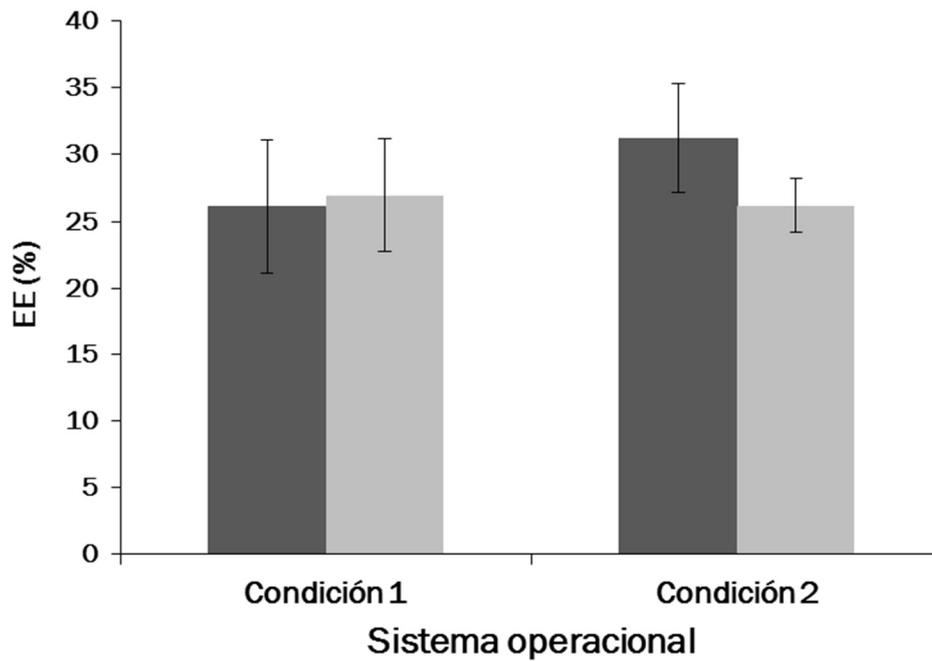


Figura 17: Eficiencia de eliminación media de CH₄ en estado estacionario en las diferentes condiciones de operación en el biorreactor *Methylobacterium* (R1, grís oscuro) y en el biorreactor consorcio (R2, grís claro). Las líneas verticales representan el error típico de las réplicas

4.2 ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN DE NUEVOS METANÓTROFOS CAPACES DE PRODUCIR ECTOINA

4.2.1 Aislamiento, selección y purificación de nuevos microorganismos

Los microorganismos que se plaquearon por estriado y se crecieron en presencia de metano se identificaron por la amplificación y secuenciación del ADN 16S rARN (Figura 18).

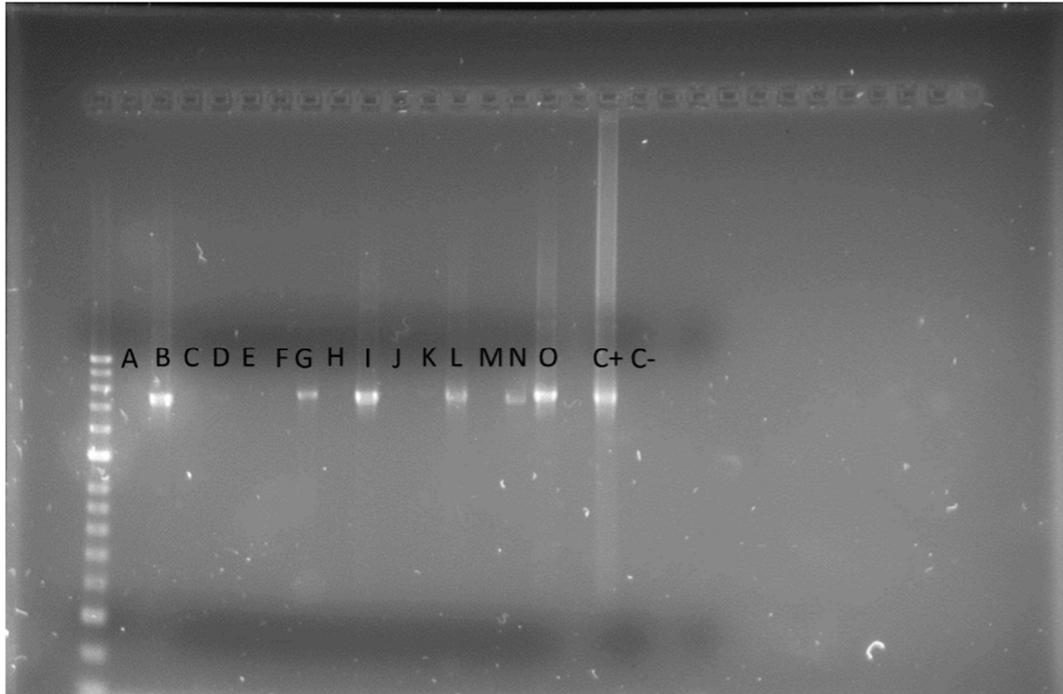


Figura 18: Identificación de aislados mediante técnica PCR.

Por su pureza al analizar su secuencia, su contenido en G-C % y su interés filogenético se seleccionaron para trabajar con ellos los aislados G e I (Tabla 3, ANEXO III.VIII).

4.2.1.1 *Alishewanella*:

La secuencia del gen 16S rARN del aislado I mostró una similaridad del 98-99 % con otras especies del género *Alishewanella* por lo que se puede determinar que pertenece a dicho género, pero es una especie no descubierta hasta el momento. El género *Alishewanella* fue descubierto en el año 2010, se trata de bacterias que aparecen en ambientes heterogéneos; como la biota intestinal, suelo o sedimentos oceánicos. Pertenece a la familia *Alteromonadaceae*, orden *Alteromonadales* y clase *Gammaproteobacteria* y hasta el momento no se habían determinado como metanótrofos o metilótrofos.

- Morfología:

De acuerdo a las imágenes tomadas con microscopía de contraste de fases del aislado puro *Alishewanella* sp. es una bacteria con morfología de coco y que tiende a mantenerse unida tras la división celular con la nueva célula hija, observándose en general en grupos de 2 ó 4 células (Figura 19).



Figura 19: Dos células del género *Alishewanella* unidas tras la división celular. Imagen obtenida a través de microscopía de contraste de fases.

- pH óptimo de crecimiento

En las Figuras 27, 28, 29 y 30 (ANEXO III.III) se muestra la evolución temporal de la concentración de CH_4 y CO_2 en cada botella a cada pH correspondiente. Se determinó que el pH óptimo de crecimiento de *Alishewanella* es 9, obteniéndose mayor biomasa a este pH y cuya tasa de degradación de metano específica fue $0.12 \text{ g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$. Los ensayos con pH 10, a pesar de oxidar CH_4 inicialmente, paran su actividad pasado un tiempo, por lo que se descarta como pH óptimo para esta investigación a pesar de que la tasa de degradación es superior a las demás (Tabla 4). Además, del resto de ensayos se ha determinado que esta bacteria crece mejor a pHs alcalinos de entre 8 y 10, por lo que se puede considerar una bacteria alcalotolerante o incluso alcalófila, para lo que serían necesarios ensayos con mayores rangos de pHs [4][81].

Tabla 4: Tasas de degradación de metano a cada pH en *Alishewanella*.

	pH			
	7	8	9	10
Tasa degradación CH_4 ($\text{g CH}_4 \text{ m}^{-3} \text{ h}^{-1}$)	0,088	0,124	0,122	0,228

-Temperatura óptima de crecimiento

En las figuras 31, 32 y 33 (ANEXO III.IV) se representan las concentraciones de metano y dióxido de carbono a lo largo del tiempo para unas temperaturas de crecimiento de 25, 30 y 37 °C respectivamente. Para el aislado *Alishewanella*, la temperatura de crecimiento óptima se encuentra entre 25 y 30 °C (figuras 31 y 32 ANEXO III.IV). Sin embargo, a 37 °C la actividad de estos microorganismos cesa, siendo incapaz de oxidar CH₄. Acorde a esta determinación, la nueva especie del género *Alishewanella* se puede determinar cómo mesófila.

- Producción de ectoína

Se determinó que *Alishewanella sp.* no es productor de ectoína.

-API 50CH y API 20A

El desarrollo de la prueba API 50CH pasadas 24, 48 (Figura 20), 72 y 96 horas (Figura 21) y de API 20 pasadas 24 horas (Figura 20) y 48 horas (Figura 21) se describe a continuación. Durante los dos primeros días no se percibieron cambios en P1, produciéndose éstos al tercer y cuarto día, y se apreció, en caso de reacción positiva, un color amarillento en las galerías (Figura 21). Debido al tiempo de degradación en *Alishewanella*, se observaron como fuentes más asimilables los azúcares GLY, ERY, LARA, DXYL, GLU, FRU, MNE, MAN, ESC, CEL, MEL, MLZ, RAF y GLYG, aunque también posee las enzimas para la degradación de los azúcares DARA, RIB, ADO, RHA, INO, SOR, MDG, AMY, TRE, TUR, LFUC y DARL (Tabla 5) (ver ANEXO III.VII para la definición de cada uno de los compuestos).

Los resultados en todos los casos negativos de la prueba API 20A demostraron, excepto para urea y para el GEL, que *Alishewanella sp.* es una bacteria aerobia estricta (Tabla 6)

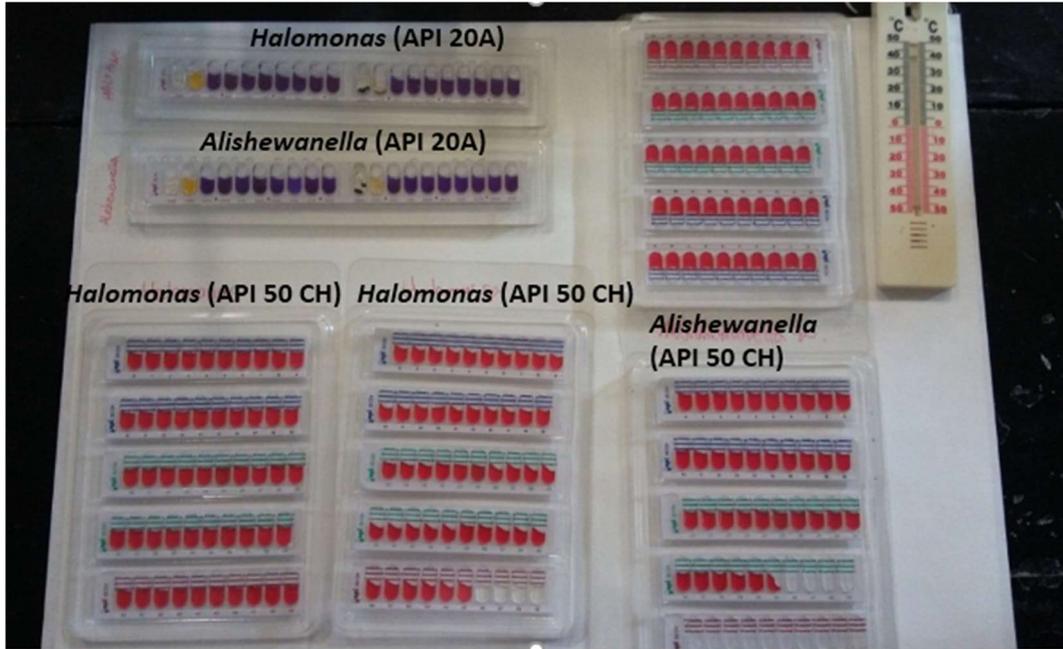


Figura 20. Prueba API 50CH (cámaras anaerobias de color rojo) para Alishewanella y Halomonas tras la inoculación de las galerías. Las pruebas API 20A (en la esquina izquierda superior) tras la inoculación de las galerías.

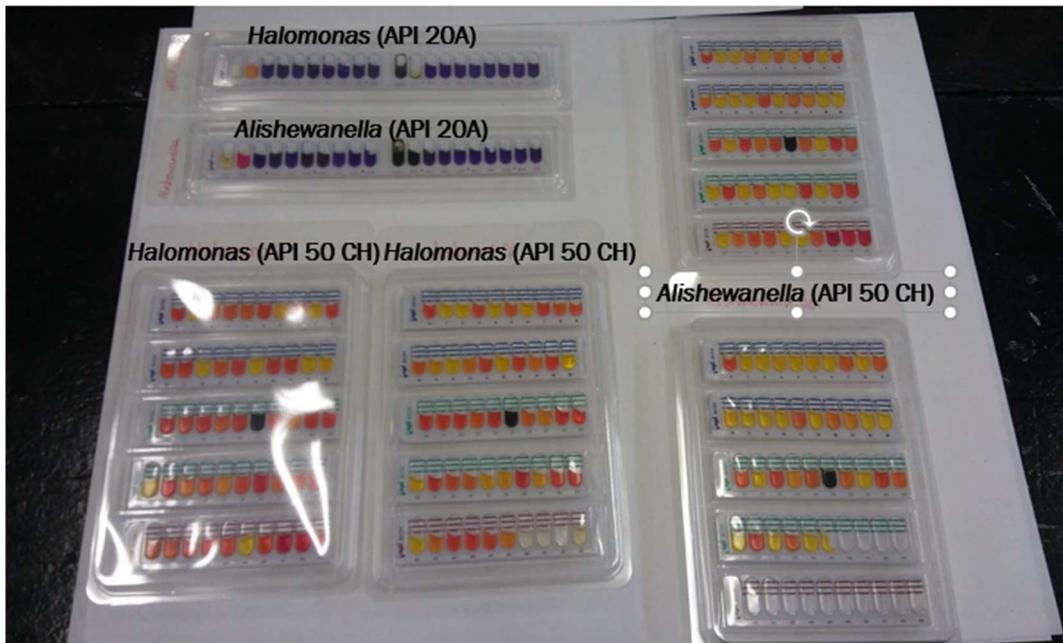


Figura 21. Pruebas API 50CH (cámaras anaerobias de color amarillo y rojo) para Alishewanella y Halomonas pasadas 96 horas desde la inoculación de las galerías. Las pruebas API 20A (en la esquina izquierda superior) tras 48 horas desde la inoculación de las galerías.

Tabla 5. Evolución temporal en la prueba API 50CH en *Alishewanella*. En la tabla de resultados se marcaron con símbolo (+) las reacciones positivas y con símbolo (-) las reacciones nulas

<i>Alishewanella</i>														
	O	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+
96 horas	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+

<i>Alishewanella</i>														
	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
96 horas	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+

<i>Alishewanella</i>														
	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
96 horas	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-

<i>Alishewanella</i>							
	TAG	DFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
24 horas	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	-	-	-	-	-	-
96 horas	-	+	+	-	-	-	-

Tabla 6. Evolución temporal en la prueba API 20A en *Alishewanella*. En la tabla de resultados se marcaron con símbolo (+) las reacciones positivas y con símbolo (-) las reacciones nulas.

<i>Alishewanella</i>										
	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

<i>Alishewanella</i>											
	GEL	ESC	GLY	CEL	IMNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.1.2 *Halomonas*:

La secuencia del gen 16S rARN del aislado G mostró una similaridad del 99-100 % con otras especies del género *Halomonas*, como consecuencia de este resultado, se puede determinar que pertenece a dicho género, aunque es una especie no descubierta hasta el momento. El género *Halomonas* fue descubierto en el año 2011, y son bacterias que aparecen en diferentes ambientes como en lagos salinos, océano o en aguas residuales. Pertenece a la familia *Oceanospirillaceae*, orden *Oceanospirillales* y clase *Gammaproteobacteria*. Hasta el momento no se habían determinado como metanótrofas o metilótrofas.

- Morfología:

De acuerdo a las imágenes tomadas con microscopía de contraste de fases del aislado puro *Halomonas sp.* es una bacteria con morfología de bacilo y que aparece sin formar filamentos como célula individual (Figura 22).



Figura 22: Una célula del género *Halomonas*. Imagen obtenida a través de microscopía de contraste de fases.

- pH óptimo de crecimiento

En las Figuras 34, 35, 36 y 37 (ANEXO III.V) se muestra la evolución temporal de la concentración de CH₄ y CO₂ en cada botella a cada pH correspondiente. El pH óptimo para degradar metano por *Halomonas* de forma óptima se determinó que era 9, obteniéndose mayor biomasa a este pH, y cuya tasa de degradación de metano específica fue 0.15 g CH₄ m⁻³ h⁻¹. Los ensayos con pH 10, a pesar de degradar CH₄ inicialmente, cesan su actividad pasado un tiempo, por lo que se descarta como pH óptimo para esta investigación aunque la tasa de degradación es superior a las demás (Tabla 7). Del resto de ensayos se ha determinado que esta bacteria crece mejor a pHs alcalinos de entre 8 y 10. Por lo que se puede considerar una bacteria alcalotolerante o incluso alcalófila, para lo que serían necesarios ensayos con mayores rangos de pHs [4][81].

Tabla 7: Tasas de degradación de metano a cada pH en *Halomonas*.

	pH			
	7	8	9	10
Tasa degradación CH ₄ (g CH ₄ m ⁻³ h ⁻¹)	0,124	0,109	0,154	0,161

-Temperatura óptima de crecimiento

En las Figuras 38, 39 y 40 (ANEXO III.VI) se representan las concentraciones de metano y dióxido de carbono a lo largo del tiempo para unas temperaturas

de crecimiento de 25, 30 y 37 °C respectivamente. Para el aislado *Halomonas*, la temperatura de crecimiento óptima se encuentra a 30 °C (Figura 39 ANEXO III.VI). Sin embargo, a 25 y 37 °C la actividad de estos microorganismos cesa, siendo incapaz de oxidar CH₄. De acuerdo a esta determinación, la nueva especie del género *Halomonas* se puede determinar cómo mesófila.

- Producción de ectoína:

Se determinó que el género *Halomonas sp.* es capaz de producir ectoína.

-API 50CH y API 20A

El desarrollo de la prueba API 50CH pasadas 24, 48, 72 y 96 horas y de API20 pasadas 24 y 48 horas se muestra a continuación (Tabla 8 y 9 respectivamente) (Figuras 20 y 21). Durante los dos primeros días no se apreciaron cambios en P1, produciéndose al tercer y cuarto día, y se observó, en caso de reacción positiva, un color amarillento en las galerías (Figura 21). Debido a los diferentes tiempos de degradación de azúcares en *Halomonas*, se observaron como fuentes más asimilables los azúcares ESC, MEL, GLYG y TUR, aunque también posee enzimas para la degradación de los azúcares GLY, ERY, LARA, DXYL, GLU, FRU, RHA, MAN, SOR, MLZ, RAF, LYX, DARL (Tabla 8) (ver ANEXO III.VII). Los resultados de la prueba API 20A, en todos los casos negativos, demostraron que *Halomonas sp.* es una bacteria aerobia estricta (Tabla 9) (ver ANEXO III.VII).

Tabla 8. Evolución temporal en la prueba API 50CH en *Halomonas*. En la tabla de resultados se marcaron con símbolo (+) las reacciones positivas y con símbolo (-) las reacciones nulas

<i>Halomonas</i>														
	O	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96 horas	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-

<i>Halomonas</i>													
	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
96 horas	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-

<i>Halomonas</i>													
------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
96 horas	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-

Halomonas

	LYX	TAG	DFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
72 horas	-	-	-	-	-	-	-	-
96 horas	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 9. Evolución temporal en la prueba API 20A en Halomonas. En la tabla de resultados se marcaron con símbolo (+) las reacciones positivas y con símbolo (-) las reacciones nulas

Halomonas

	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Halomonas

	GEL	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE	CAT
24 horas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48 horas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-



5.CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos del estudio de reactores de columna de burbujeo en continuo para la producción conjunta de ectoína, polihidroxicanoatos y exopolisacáridos con una concentración al 6% de NaCl y a diferentes concentraciones de magnesio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- La mayor producción de ectoína intracelular en estado estacionario se obtuvo con una concentración de magnesio de 0.2 g L^{-1} . Se observó que la disminución de concentración de magnesio en el medio de cultivo afecta negativamente a la producción de ectoína intracelular ya que este nutriente tiene presencia en la ruta metabólica de dicho subproducto.
- La mayor concentración de PHBs en estado estacionario se alcanzó en el reactor consorcio. Además, la falta de magnesio fomentó la producción de PHBs.
- La producción de EPSs se ve favorecida a altas concentraciones de magnesio en el medio y fue detectada en mayores concentraciones en el reactor consorcio.
- La capacidad de eliminación, la eficiencia de eliminación y la producción de CO_2 no se vieron influenciadas por la concentración de magnesio en el medio.

Este estudio prueba la importancia de las condiciones de operación, dependiendo del subproducto que se quiera sintetizar industrialmente, en concreto el efecto que tiene el magnesio en la síntesis de ectoína, exopolisacáridos, y polihidroxicanoatos utilizando microorganismos metanótrofos.

De la evaluación de los ensayos de nuevos aislados metanótrofos se deducen las siguientes consideraciones:

- Se determinó una nueva especie de bacteria perteneciente al género *Alishewanella*, género no determinado hasta ahora como degradador de metano. Los estudios realizados de optimización definieron a esta nueva especie como mesófila, alcalotolerante, halotolerante, aerobia y con morfología cocoide. Además, esta bacteria se identificó como ca-



paz de degradar ciertos monosacáridos y disacáridos, pero no capaz de producir ectoína como osmoprotector.

- La segunda especie de bacteria determinada pertenece al género *Halomonas*, género no reconocido como degradador de metano hasta ahora. Los estudios de optimización llevados a cabo determinaron a la nueva especie como mesófila, halotolerante, alcalotolerante, aerobia y con morfología de bacilo. Esta bacteria se identificó como capaz de oxidar determinados monosacáridos y disacáridos y, además, se determinó que era un género capaz de producir ectoína como osmoprotector.



6.BIBLIOGRAFÍA



- [1] S. Cantera, R. Lebrero, L. Sadornil, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement, *J. Environ. Manage.* 182 (2016) 160–165. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.064.
- [2] J.C. López, G. Quijano, T.S.O. Souza, Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄ , N₂O , and CO₂) abatement: State of the art and challenges, (2015). doi:10.1007/s00253-013-4734-z.
- [3] European Environment Agency (EEA), *The European Environment: State and Outlook 2015: Synthesis*, *Eur. Environ.* (2015) 42. doi:10.2800/45773.
- [4] R.S. Hanson, T.E. Hanson, Methanotrophic bacteria., *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 439–471. doi:<p></p>.
- [5] IPCC, *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, 2014. doi:10.1017/CBO9781107415324.
- [6] C. Ménard, A.A. Ramirez, J. Nikiema, M. Heitz, Effect of trace gases, toluene and chlorobenzene, on methane biofiltration: An experimental study, *Chem. Eng. J.* 204–205 (2012) 8–15. doi:10.1016/j.cej.2012.07.070.
- [7] J.M. Estrada, R. Lebrero, G. Quijano, R. Pérez, I. Figueroa-González, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Methane abatement in a gas-recycling biotrickling filter: Evaluating innovative operational strategies to overcome mass transfer limitations, *Chem. Eng. J.* 253 (2014) 385–393. doi:10.1016/j.cej.2014.05.053.
- [8] J. Nikiema, R. Brzezinski, M. Heitz, Elimination of methane generated from landfills by biofiltration: a review, *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology.* 6 (2007) 261–284. doi:10.1007/s11157-006-9114-z.
- [9] C. Scheutz, P. Kjeldsen, J.E. Bogner, A. De Visscher, J. Gebert, H.A. Hilger, M. Huber-Humer, K. Spokas, Microbial methane oxidation processes and technologies for mitigation of landfill gas emissions, *Waste Manag. Res.* 27 (2009) 409–455. doi:10.1177/0734242X09339325.
- [10] Indicator Assessment | Data and maps Atmospheric greenhouse gas concentrations, (n.d.). <http://www.eea.europa.eu/downloads/dc071f7f825846e38f1be89738d75136/1464772645/assessment.pdf> (accessed April 22, 2017).
- [11] O. US EPA, Sources of Greenhouse Gas Emissions, (n.d.). <https://www.epa.gov/ghgemissions/sources-greenhouse-gas-emissions> (accessed

- May 23, 2017).
- [12] S. Cantera, R. Lebrero, E. Rodríguez, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Continuous abatement of methane coupled with ectoine production by *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z in stirred tank reactors: A step further towards greenhouse gas biorefineries, *J. Clean. Prod.* 152 (2017) 134–141. doi:10.1016/j.jclepro.2017.03.123.
- [13] A. Avalos Ramirez, B.P. García-Aguilar, J.P. Jones, M. Heitz, Improvement of methane biofiltration by the addition of non-ionic surfactants to biofilters packed with inert materials, *Process Biochem.* 47 (2012) 76–82. doi:10.1016/j.procbio.2011.10.007.
- [14] Fifth Assessment Report - Synthesis Report, (n.d.). <https://www.ipcc.ch/report/ar5/syr/> (accessed April 24, 2017).
- [15] J.C. López, G. Quijano, T.S.O. Souza, J.M. Estrada, R. Lebrero, R. Muñoz, Biotechnologies for greenhouse gases (CH₄, N₂O, and CO₂) abatement: state of the art and challenges, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 2277–2303. doi:10.1007/s00253-013-4734-z.
- [16] M. Heitz, J. Nikiema, The use of inorganic packing materials during methane biofiltration, *Int. J. Chem. Eng.* 2010 (2010). doi:10.1155/2010/573149.
- [17] Fifth Assessment Report - Mitigation of Climate Change, (n.d.). <http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg3/> (accessed April 29, 2017).
- [18] Estrategia Española de Cambio Climático y Energía Limpia - Publicaciones y documentación - Cambio climático - mapama.es, (n.d.). <http://www.mapama.gob.es/es/cambio-climatico/publicaciones/documentacion/estrategia-espanola-de-lucha-contr-el-cambio-climatico/> (accessed April 24, 2017).
- [19] J. de C. y León, Resultados de la búsqueda: Medio Ambiente de Castilla y León. jcy. [En línea] 2 de diciembre de 2009., (n.d.). http://www.medioambiente.jcyl.es/web/jcyl/MedioAmbiente/es/PlantillaPaginaBuscadorGeneral/1246988359553/_/_/?q=Medio+Ambiente+de+Castilla+y+León.+jcy+l.+%5BEn+línea%5D+2+de+diciembre+de+2009.+&client=buscadorGeneral&gsite=portal_MedioAmbiente&buscar=buscar (accessed April 24, 2017).
- [20] J.M. Estrada, N.J.R. (Bart) Kraakman, R. Lebrero, R. Muñoz, A sensitivity analysis of process design parameters, commodity prices and robustness on the economics of odour abatement technologies, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1354–1363. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.010.

- [21] M. Girard, A.A. Ramirez, G. Buelna, M. Heitz, Biofiltration of methane at low concentrations representative of the piggery industry-Influence of the methane and nitrogen concentrations, *Chem. Eng. J.* 168 (2011) 151–158. doi:10.1016/j.cej.2010.12.054.
- [22] C.R. Teodoru, F.C. Nyoni, A. V. Borges, F. Darchambeau, I. Nyambe, S. Bouillon, Dynamics of greenhouse gases (CO₂, CH₄, N₂O) along the Zambezi River and major tributaries, and their importance in the riverine carbon budget, *Biogeosciences*. 12 (2015) 2431–2453. doi:10.5194/bg-12-2431-2015.
- [23] J.D. Semrau, Bioremediation via methanotrophy: Overview of recent findings and suggestions for future research, *Front. Microbiol.* 2 (2011) 1–7. doi:10.3389/fmicb.2011.00209.
- [24] P.J. Strong, M. Kalyuzhnaya, J. Silverman, W.P. Clarke, A methanotroph-based biorefinery: Potential scenarios for generating multiple products from a single fermentation, *Bioresour. Technol.* 215 (2016) 314–323. doi:10.1016/j.biortech.2016.04.099.
- [25] P.J. Strong, S. Xie, W.P. Clarke, Methane as a resource: Can the methanotrophs add value?, *Environ. Sci. Technol.* 49 (2015) 4001–4018. doi:10.1021/es504242n.
- [26] S.N. Dedysh, C. Knief, P.F. Dunfield, *Methylocella* Species Are Facultatively Methanotrophic, *J. Bacteriol.* 187 (2005) 4665–4670. doi:10.1128/JB.187.13.4665-4670.2005.
- [27] S.E. Belova, M. Baani, N.E. Suzina, P.L.E. Bodelier, W. Liesack, S.N. Dedysh, Acetate utilization as a survival strategy of peat-inhabiting *Methylocystis* spp., *Environ. Microbiol. Rep.* 3 (2011) 36–46. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00180.x.
- [28] J. Im, S.-W. Lee, S. Yoon, A.A. DiSpirito, J.D. Semrau, Characterization of a novel facultative *Methylocystis* species capable of growth on methane, acetate and ethanol, *Environ. Microbiol. Rep.* 3 (2011) 174–181. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00204.x.
- [29] J. Im, J.D. Semrau, Pollutant degradation by a *Methylocystis* strain SB2 grown on ethanol: bioremediation via facultative methanotrophy, *FEMS Microbiol. Lett.* 318 (2011) 137–142. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02249.x.
- [30] R. Whittenbury, H. Dalton, *The Methylophilic Bacteria*, in: *The Prokaryotes*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1981: pp. 894–902. doi:10.1007/978-3-662-13187-9_71.
- [31] H.J.M. Op den Camp, T. Islam, M.B. Stott, H.R. Harhangi, A. Hynes, S. Schouten,

- M.S.M. Jetten, N.K. Birkeland, A. Pol, P.F. Dunfield, Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic Verrucomicrobia, *Environ. Microbiol. Rep.* 1 (2009) 293–306. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00022.x.
- [32] J.D. Semrau, A.A. DiSpirito, S. Yoon, Methanotrophs and copper, *FEMS Microbiol. Rev.* 34 (2010) 496–531. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00212.x.
- [33] J.L. Dubois, S. Ojha, *Sustaining Life on Planet Earth: Metalloenzymes Mastering Dioxide and Other Chewy Gases*, 2015. doi:10.1007/978-3-319-12415-5.
- [34] R. Balasubramanian, S.M. Smith, S. Rawat, A. Liliya, T.L. Stemmler, A.C. Rosenzweig, Oxidation of methane by a biological dicopper center, *Nat. Rev. Microbiol.* 465 (2010) 115–119. doi:10.1038/nature08992.Oxidation.
- [35] S. Cantera, R. Lebrero, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Evaluation of the influence of methane and copper concentration and methane mass transport on the community structure and biodegradation kinetics of methanotrophic cultures, *J. Environ. Manage.* 171 (2016) 11–20. doi:10.1016/j.jenvman.2016.02.002.
- [36] C. Knief, Diversity and habitat preferences of cultivated and uncultivated aerobic methanotrophic bacteria evaluated based on pmoA as molecular marker, *Front. Microbiol.* 6 (2015). doi:10.3389/fmicb.2015.01346.
- [37] I.R. McDonald, L. Bodrossy, Y. Chen, J.C. Murrell, Molecular ecology techniques for the study of aerobic methanotrophs, *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (2008) 1305–1315. doi:10.1128/AEM.02233-07.
- [38] H. Carlsen, L. Joergensen, H. Degn, Inhibition by ammonia of methane utilization in *Methylococcus capsulatus* (Bath), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 (1991) 124–127. doi:10.1007/BF00180649.
- [39] V.C. Pandey, J.S. Singh, D.P. Singh, R.P. Singh, Methanotrophs: promising bacteria for environmental remediation, *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 11 (2014) 241–250. doi:10.1007/s13762-013-0387-9.
- [40] J.M. Pastor, M. Salvador, M. Argandoña, V. Bernal, M. Reina-Bueno, L.N. Csonka, J.L. Iborra, C. Vargas, J.J. Nieto, M. Cánovas, Ectoines in cell stress protection: Uses and biotechnological production, *Biotechnol. Adv.* 28 (2010) 782–801. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.06.005.
- [41] E.A. Galinski, H.G. Trüper, Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems, *FEMS Microbiol. Rev.* 15 (1994) 95–108. doi:10.1111/j.1574-6976.1994.tb00128.x.
- [42] T. Sauer, E.A. Galinski, Bacterial milking: A novel bioprocess for production of

- compatible solutes., *Biotechnol. Bioeng.* 57 (1998) 306–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10099207> (accessed April 19, 2017).
- [43] V.N. Khmelenina, Isolation and Characterization of Halotolerant Alkaliphilic Methanotrophic Bacteria from Tuva Soda Lakes, *Curr. Microbiol.* 35 (1997) 257–261. doi:10.1007/s002849900249.
- [44] A.S. Reshetnikov, I.I. Mustakhimov, V.N. Khmelenina, Y.A. Trotsenko, Cloning, Purification, and Characterization of Diaminobutyrate Acetyltransferase from the Halotolerant Methanotroph *Methylobacterium alcaliphilum* 20Z, *Biochem.* 70 (2005) 878–883. doi:10.1007/s10541-005-0197-x.
- [45] A.S. Reshetnikov, V.N. Khmelenina, Y.A. Trotsenko, Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph “*Methylobacterium alcaliphilum* 20Z,” *Arch. Microbiol.* 184 (2006) 286–297. doi:10.1007/s00203-005-0042-z.
- [46] A. Steinbüchel, H.E. Valentin, Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, *FEMS Microbiol. Lett.* 128 (1995) 219–228. doi:10.1111/j.1574-6968.1995.tb07528.x.
- [47] A. Nath, M. Dixit, A. Bandiya, S. Chavda, A.J. Desai, Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 5749–5755. doi:10.1016/j.biortech.2007.10.017.
- [48] L.R. Castilho, D.A. Mitchell, D.M.G. Freire, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 5996–6009. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.088.
- [49] B. Laycock, P. Halley, S. Pratt, A. Werker, P. Lant, The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 536–583. doi:10.1016/j.progpolymsci.2012.06.003.
- [50] S. Chanprateep, Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates, *J. Biosci. Bioeng.* 110 (2010) 621–632. doi:10.1016/j.jbiosc.2010.07.014.
- [51] G.-Q. Chen, Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates, in: 2010: pp. 17–37. doi:10.1007/978-3-642-03287-5_2.
- [52] G.-Q. Chen, A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 2434. doi:10.1039/b812677c.
- [53] G.-Q. Chen, *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*, Springer,

- 2010.
- [54] E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez, Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging, *Express Polym. Lett.* 8 (2014) 791–808.
- [55] M. Koller, A. Salerno, A. Muhr, A. Reiterer, G. Braunegg, Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Polymers and Plastics from Renewable Resources, *Mater. Technol.* 46 (2012) 23–30.
- [56] K.H. Rostkowski, C.S. Criddle, M.D. Lepech, Cradle-to-Gate Life Cycle Assessment for a Cradle-to-Cradle Cycle: Biogas-to-Bioplastic (and Back), *Environ. Sci. Technol.* (2012) 120906114531007. doi:10.1021/es204541w.
- [57] R. Whittenbury, K.C. Phillips, J.F. Wilkinson, Enrichment, Isolation and Some Properties of Methane-utilizing Bacteria, *J. Gen. Microbiol.* 61 (1970) 205–218. doi:10.1099/00221287-61-2-205.
- [58] M. Vecherskaya, C. Dijkema, A.J.M. Stams, Intracellular PHB conversion in a Type II methanotroph studied by ¹³C NMR, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26 (2001) 15–21. doi:10.1038/sj.jim.7000086.
- [59] O.P. Karthikeyan, K. Chidambarampadmavathy, S. Cirés, K. Heimann, Review of Sustainable Methane Mitigation and Biopolymer Production, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 45 (2015) 1579–1610. doi:10.1080/10643389.2014.966422.
- [60] J. Helm, K.-D. Wendlandt, M. Jechorek, U. Stottmeister, Potassium deficiency results in accumulation of ultra-high molecular weight poly- β -hydroxybutyrate in a methane-utilizing mixed culture, *J. Appl. Microbiol.* 105 (2008) 1054–1061. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03831.x.
- [61] J. Myung, J.C.A. Flanagan, R.M. Waymouth, C.S. Criddle, Methane or methanol-oxidation dependent synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by obligate type II methanotrophs, *Process Biochem.* 51 (2016) 561–567. doi:10.1016/j.procbio.2016.02.005.
- [62] A.J. Cal, W.D. Sikkema, M.I. Ponce, D. Franqui-Villanueva, T.J. Riiff, W.J. Orts, A.J. Pieja, C.C. Lee, Methanotrophic production of polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate with high hydroxyvalerate content, *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 302–307. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.056.
- [63] J. Myung, M. Kim, M. Pan, C.S. Criddle, S.K.Y. Tang, Low energy emulsion-based fermentation enabling accelerated methane mass transfer and growth of poly(3-hydroxybutyrate)-accumulating methanotrophs, *Bioresour. Technol.* 207 (2016)

- 302–307. doi:10.1016/j.biortech.2016.02.029.
- [64] G.-Y. Tan, C.-L. Chen, L. Li, L. Ge, L. Wang, I. Razaad, Y. Li, L. Zhao, Y. Mo, J.-Y. Wang, Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review, *Polymers (Basel)*. 6 (2014) 706–754. doi:10.3390/polym6030706.
- [65] A.J. Pieja, E.R. Sundstrom, C.S. Criddle, Poly-3-hydroxybutyrate metabolism in the type II methanotroph *Methylocystis parvus* OBBP., *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 6012–9. doi:10.1128/AEM.00509-11.
- [66] J. Myung, W.M. Galega, J.D. Van Nostrand, T. Yuan, J. Zhou, C.S. Criddle, Long-term cultivation of a stable *Methylocystis* -dominated methanotrophic enrichment enabling tailored production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), *Bioresour. Technol.* 198 (2015) 811–818. doi:10.1016/j.biortech.2015.09.094.
- [67] H.-C. Flemming, T.R. Neu, D.J. Wozniak, The EPS matrix: the “house of biofilm cells”, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 7945–7. doi:10.1128/JB.00858-07.
- [68] H.-C. Flemming, J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol. Publ. Online* 02 August 2010; | doi:10.1038/nrmicro2415. 8 (2010) 623. doi:10.1038/nrmicro2415.
- [69] T. Matsumoto, H. Yamamura, J. Hayakawa, Y. Watanabe, S. Harayama, Influence of extracellular polysaccharides (EPS) produced by two different green unicellular algae on membrane filtration in an algae-based biofuel production process, *Water Sci. Technol.* 69 (2014) 1919. doi:10.2166/wst.2014.104.
- [70] B. Argilagos, R. Torrens, H.C. de la, B. Rodríguez, Inducción de antibiorresistencia en *Escherichia coli* enterotoxigénica con cobre -Induction of antibiotic-resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* with copper, (n.d.). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> (accessed May 23, 2017).
- [71] F. Sarwat, S.A.U. Qader, A. Aman, N. Ahmed, Production & characterization of a unique dextran from an indigenous *Leuconostoc mesenteroides* CMG713, *Int. J. Biol. Sci.* 4 (2008) 379–386. doi:10.3891/acta.chem.scand.22-1907.
- [72] S.E. (Stephen E.. Harding, An introduction to polysaccharide biotechnology, n.d. [https://books.google.es/books?id=721dDgAAQBAJ&pg=PA220&lpg=PA220&dq=Morris+GA,+Harding+SE+\(2009\)+Polysaccharides,+microbial.+In:+Schaechter+M+\(ed\),+Encyclopedia+of+microbiology,+3rd+edn,+Elsevier,+Amsterdam,+pp.+482+–+494.&source=bl&ots=-glvIHsriY&sig=FgMI](https://books.google.es/books?id=721dDgAAQBAJ&pg=PA220&lpg=PA220&dq=Morris+GA,+Harding+SE+(2009)+Polysaccharides,+microbial.+In:+Schaechter+M+(ed),+Encyclopedia+of+microbiology,+3rd+edn,+Elsevier,+Amsterdam,+pp.+482+–+494.&source=bl&ots=-glvIHsriY&sig=FgMI) (accessed April 12, 2017).
- [73] U.U. Nwodo, E. Green, A.I. Okoh, Bacterial exopolysaccharides: Functionality and prospects, *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 14002–14015. doi:10.3390/ijms131114002.

- [74] F. García-Ochoa, V. Santos, J. Casas, E. Gómez, Xanthan gum: production, recovery, and properties, *Biotechnol. Adv.* 18 (2000) 549–579. doi:10.1016/S0734-9750(00)00050-1.
- [75] Y.R. Malashenko, T.P. Pirog, V.A. Romanovskaya, I.G. Sokolov, T.A. Grinberg, Search for Methanotrophic Producers of Exopolysaccharides, *Appl. Biochem. Microbiol.* 37 (2001) 599–602. doi:10.1023/A:1012307202011.
- [76] J.H. Wilshusen, J.P.A. Hettiaratchi, A. De Visscher, R. Saint-Fort, Methane oxidation and formation of EPS in compost: Effect of oxygen concentration, *Environ. Pollut.* 129 (2004) 305–314. doi:10.1016/j.envpol.2003.10.015.
- [77] W. Chiemchaisri, J.S. Wu, C. Visvanathan, Methanotrophic production of extracellular polysaccharide in landfill cover soils, in: *Water Sci. Technol.*, 2001: pp. 151–158.
- [78] X.M. Wei, Y. Su, H.T. Zhang, M. Chen, R. He, Responses of methanotrophic activity, community and EPS production to CH₄ and O₂ concentrations in waste biocover soils, *Waste Manag.* 42 (2015) 118–127. doi:10.1016/j.wasman.2015.04.005.
- [79] M.G. Kalyuzhnaya, V. Khmelenina, B. Eshinimaev, D. Sorokin, H. Fuse, M. Lidstrom, Y. Trotsenko, Classification of halo(alkali)philic and halo(alkali)tolerant methanotrophs provisionally assigned to the genera *Methylomicrobium* and *Methylobacter* and emended description of the genus *Methylomicrobium*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58 (2008) 591–596. doi:10.1099/ijs.0.65317-0.
- [80] S. Cantera, J.M. Estrada, R. Lebrero, P.A. García-Encina, R. Muñoz, Comparative performance evaluation of conventional and two-phase hydrophobic stirred tank reactors for methane abatement: Mass transfer and biological considerations, *Biotechnol. Bioeng.* 113 (2016) 1203–1212.
- [81] M.T. Madigan, *Brock : biología de los microorganismos*, Pearson Addison Wesley, 2009. <https://www.casadellibro.com/libro-brock-biologia-de-los-microorganismos-12-edicion/9788478290970/1485756> (accessed May 25, 2017).
- [82] W. Verstraete, Ed., *Environmental biotechnology*, Londres: ESEB, 2004., (n.d.). [https://pure.tudelft.nl/portal/en/publications/biodiversity-and-application-of-anaerobic-ammoniumoxidizing-bacteria\(4c3d6d01-fe13-4cce-894a-68da331aef04\).html](https://pure.tudelft.nl/portal/en/publications/biodiversity-and-application-of-anaerobic-ammoniumoxidizing-bacteria(4c3d6d01-fe13-4cce-894a-68da331aef04).html) (accessed May 17, 2017).
- [83] Home - American Water Works Association, (n.d.). <https://www.awwa.org/> (accessed May 16, 2017).



- [84] R. Lebrero, J.C. López, I. Lehtinen, R. Pérez, G. Quijano, R. Muñoz, Exploring the potential of fungi for methane abatement: Performance evaluation of a fungal-bacterial biofilter, *Chemosphere*. 144 (2016) 97–106. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.08.017.
- [85] A. Anjum, M. Zuber, K.M. Zia, A. Noreen, M.N. Anjum, S. Tabasum, Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements, *Int. J. Biol. Macromol.* 89 (2016) 161–174. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069.
- [86] L.R. Castilho, D.A. Mitchell, D.M.G. Freire, Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 5996–6009. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.088.
- [87] P. Strong, B. Laycock, S. Mahamud, P. Jensen, P. Lant, G. Tyson, S. Pratt, The Opportunity for High-Performance Biomaterials from Methane, *Microorganisms*. 4 (2016) 11. doi:10.3390/microorganisms4010011.
- [88] P. Aranda, E.Y. Planells Juan Llopis, 91 MAGNESIO Magnesio Scientific Communication: Art o Technique?, *Ars Pharm.* 41 (2000) 91–100. <http://www.ugr.es/~ars/abstract/41-91-00.pdf> (accessed June 20, 2017).
- [89] J. Hernández, S. Gómez-Cuervo, F. Omil, EPS and SMP as stability indicators during the biofiltration of diffuse methane emissions, *Water. Air. Soil Pollut.* 226 (2015). doi:10.1007/s11270-015-2576-2.
- [90] N.K. Kılıç, G. Dönmez, Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp., and *Ochrobactrum* sp., *J. Hazard. Mater.* 154 (2008) 1019–1024. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.11.008.